

# **Transduktionsspendermutanten im System Salmonella typhimurium/Phage P22**

**Beschreibung eines Modifikations-Restriktions-Systems  
mit unterschiedlicher Wirkung auf  
transduzierende und infektiöse DNS von P22-Phagen**

**Ursula Kinkeldey**

**1978**





DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG  
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Transduktionsspendermutanten im System  
Salmonella typhimurium/Phage P22

Beschreibung eines Modifikations-Restriktions-Systems  
mit unterschiedlicher Wirkung auf transduzierende und  
infektiöse DNS von P22-Phagen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Ursula Kinkeldey, geb. Rühling  
aus  
Dorfen im Isartal

1978

Die vorliegende Arbeit wurde vom Sommer 1973 bis Herbst 1977 am Genetischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Horst Schmieger durchgeführt.

1. Berichterstatter: Professor Dr. Horst Schmieger
  2. Berichterstatter: Professor Dr. Karl-Heinz Schleifer
- Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 1978

# VERGLEICHENDE ANATOMIE

## 1. EINLEITUNG

1.1. Das Problem der Systematik und der Phylogenie

1.2. Bedeutung einer systematischen Klassifikation

1.3. Ziele und Aufgaben der vergleichenden Anatomie

Für Milian und Rapunzel

## 2. SYSTEMATISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Hierarchische Ebenen der Systematik

2.2. Taxonomische Methoden

2.3. Nomenklatur und Typisierung

2.4. Systematische Prinzipien

2.5. Systematische Grundlagen der Zoologie

2.6. Systematische Grundlagen der Botanik

2.7. Systematische Grundlagen der Tierwelt

2.8. Systematische Grundlagen der Pflanzenwelt

## 3. VERGLEICHENDE ANATOMIE

3.1. Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere

3.2. Vergleichende Anatomie der Insekten

3.3. Vergleichende Anatomie der Mollusken

3.4. Vergleichende Anatomie der Arthropoden

3.5. Vergleichende Anatomie der Platyhelminthes

3.6. Vergleichende Anatomie der Nematoden

3.7. Vergleichende Anatomie der Cnidarien

3.8. Vergleichende Anatomie der Siphonophoren

3.9. Vergleichende Anatomie der Echinodermata

3.10. Vergleichende Anatomie der Mollusca

3.11. Vergleichende Anatomie der Annelida

3.12. Vergleichende Anatomie der Crustacea

3.13. Vergleichende Anatomie der Chelicerata

3.14. Vergleichende Anatomie der Insecta

3.15. Vergleichende Anatomie der Arachnida

3.16. Vergleichende Anatomie der Chilopoda

3.17. Vergleichende Anatomie der Diplopoda

Die vollständige Ausgabe des 17. Jahrhunderts  
ist durch die Ausgabe des 18. Jahrhunderts  
nicht zu ersetzen, da die Ausgabe des  
17. Jahrhunderts die ursprüngliche Fassung  
darstellt.



1. Universitätsbibliothek Leiden, Dept. Manuscripts  
2. Universitätsbibliothek Leiden, Dept. Rare Books  
Bijz. van de Universiteitsbibliothek, 17. eeuw, 1771

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                              |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. EINLEITUNG .....                                                                                                          | 1-11  |
| 1. Das Phänomen der Restriktion und Modifikation ..                                                                          | 1     |
| 2. Entdeckung einer Restriktions-Modifikations-<br>mutante durch die Isolierung einer Transduk-<br>tionsspendermutante ..... | 10    |
| B. MATERIAL UND METHODEN .....                                                                                               | 12-39 |
| 1. Material .....                                                                                                            | 12-22 |
| 1.1. Bakterienstämme .....                                                                                                   | 12-15 |
| 1.1.1. Salmonella typhimurium .....                                                                                          | 12    |
| 1.1.2. Escherichia coli .....                                                                                                | 15    |
| 1.2. Bakteriophagen .....                                                                                                    | 16-18 |
| 1.2.1. Phagen von S. typhimurium .....                                                                                       | 16    |
| 1.2.2. Phagen von E.coli .....                                                                                               | 18    |
| 1.3. Medien, Lösungen, Chemikalien .....                                                                                     | 18-22 |
| 2. Methoden .....                                                                                                            | 23-39 |
| 2.1. Übernachtkulturen .....                                                                                                 | 23    |
| 2.2. Phagenlysat .....                                                                                                       | 23    |
| 2.3. Konzentrieren und Reinigen von Phagenlysaten<br>in CsCl-Stufengradienten .....                                          | 23    |
| 2.4. Bestimmen von Phagentitern .....                                                                                        | 24    |
| 2.5. Bestimmen des eop-Wertes .....                                                                                          | 24    |
| 2.6. Lysogenisieren der Bakterienstämme .....                                                                                | 25    |
| 2.7. Lysogenietest .....                                                                                                     | 25    |
| 2.8. Transduktion .....                                                                                                      | 26    |
| 2.9. Berechnung des T/P-Wertes .....                                                                                         | 27    |
| 2.10. Transduktion mit alysogenem Empfänger .....                                                                            | 27    |
| 2.11. Cotransduktion .....                                                                                                   | 27    |
| 2.12. F-Duktion .....                                                                                                        | 28    |
| 2.13. Herstellen von streptomycinresistenten<br>Zellen .....                                                                 | 29    |
| 2.14. Herstellen von <sup>14</sup> C-markierter P22-Phagen-<br>DNS .....                                                     | 30    |

|         |                                                                                                                     |        |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.15.   | Herstellung von $^3\text{H}$ -markierter A1a- und KB-<br>Phagen-DNS .....                                           | 30     |
| 2.16.   | DNS-Extraktion mit Sarkosyl .....                                                                                   | 31     |
| 2.17.   | Infektion von Bakterien mit $^3\text{H}$ -markierten<br>A1a-Phagen und Reextrahierung der markier-<br>ten DNS ..... | 31     |
| 2.18.   | Phenolextraktion von DNS .....                                                                                      | 32     |
| 2.19.   | Zentrifugation von DNS im neutralen<br>5-20%igen Sucrose-Gradienten .....                                           | 32     |
| 2.20.   | Auswertung der Gradienten .....                                                                                     | 33     |
| 2.21.   | Bestimmung des Molekulargewichts der zen-<br>trifugierten DNS .....                                                 | 33     |
| 2.22.   | Strichtest zur Identifizierung von<br>Restriktionsmutanten .....                                                    | 34     |
| 2.23.   | Mutagenisieren von Bakterien .....                                                                                  | 35     |
| 2.24.   | Sprühmethode zum Auffinden von LD-Mutanten ..                                                                       | 35     |
| 2.25.   | Mutagenisieren von Phagen .....                                                                                     | 36     |
| 2.26.   | Isolieren von P22-Mutanten, die gegen LD-<br>spezifische Restriktion sensitiv sind .....                            | 36     |
| 2.27.   | Mischinfektion mit P22 und den Phagen<br>A1a, A3 oder L .....                                                       | 37     |
| 2.27.1. | Mischinfektion mit P22 und dem Phagen A1a..                                                                         | 37     |
| 2.27.2. | Mischinfektion mit P22 und den Phagen<br>A3, bzw. L .....                                                           | 37     |
| 2.28.   | Kreuzung des Phagen L mit verschiedenen<br>amber-Mutanten des Phagen P22 .....                                      | 38     |
| C.      | ERGEBNISSE .....                                                                                                    | 40-109 |
| 1.      | Nachweis und Beschreibung eines RM-Systems .....                                                                    | 40-78  |
| 1.1.    | Transduktion mit alysogenem Empfänger .....                                                                         | 40     |
| 1.2.    | Transduktion zwischen LD-Spender und<br>LD-Empfänger .....                                                          | 43     |
| 1.3.    | Cotransduktion .....                                                                                                | 48     |
| 1.4.    | Die eop-Werte verschiedener Salmonellaphagen..                                                                      | 56     |

|                                                                                                                                                          |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1.5. Untersuchung verschiedener Marker des<br>S. typhimurium-Chromosoms auf ihren Grad<br>der Restriktion .....                                          | 65      |
| 1.6. F-Duktion .....                                                                                                                                     | 70      |
| 1.7. Molekulargewichtsbestimmung restringier-<br>ter DNS .....                                                                                           | 73      |
| 2. Identifizierung des Systems .....                                                                                                                     | 79-84   |
| 2.1. Vergleich des LD10-Systems mit dem SA-<br>System durch die Bestimmung von eop-Werten<br>LD10-gezogener Phagen auf einer SA-System-<br>Mutante ..... | 80      |
| 2.2. Bestimmung der eop-Werte von fünf 4423-ge-<br>zogenen Phagen auf dem Stamm LD10 .....                                                               | 81      |
| 2.3. Kartierung durch Cotransduktion .....                                                                                                               | 83      |
| 3. Anwendung der Sprühmethode zur Isolierung<br>weiterer RM-Mutanten .....                                                                               | 85      |
| 4. Aspekte zur Immunität des P22 gegen das<br>SA-System .....                                                                                            | 89-109  |
| 4.1. Isolierung von P22-Mutanten, die sensitiv<br>sind gegen das SA-System .....                                                                         | 90      |
| 4.2. Mischinfektionen zur Überprüfung P22-<br>codierter Schutzfunktionen .....                                                                           | 94-99   |
| 4.2.1. Mischinfektion mit P22 und dem Phagen A1a..                                                                                                       | 94      |
| 4.2.2. Mischinfektion mit P22 und den Phagen<br>A3, bzw. L .....                                                                                         | 96      |
| 4.3. Kreuzung des Phagen L mit verschiedenen<br>amber-Mutanten des Phagen P22 .....                                                                      | 100     |
| D. DISKUSSION .....                                                                                                                                      | 110-127 |
| E. ZUSAMMENFASSUNG .....                                                                                                                                 | 128-131 |
| F. LITERATURVERZEICHNIS .....                                                                                                                            | 132-147 |



## A. EINLEITUNG

### 1. Das Phänomen der Restriktion und Modifikation

Seit über 20 Jahren beobachtet man, daß viele Bakterienstämme die Ausprägung exogener DNS in ihrer Zelle erheblich behindern können. Beispielsweise kann es sein, daß bei einer Infektion von Bakterien mit Phagen, deren DNS vom Wirt als "fremd" erkannt wird, nur ein ganz geringer Teil der injizierten DNS in diesem Wirt repliziert wird. Der größte Teil wird durch bakterieneigene Enzyme zerschnitten, wodurch die Produktion von Phagennachkommen verhindert wird. Dieses Phänomen nennt man Restriktion. Beobachtet man nun die Nachkommen der wenigen Phagen, die das Zerstörungswerk ihres Wirtes überlebt haben, so zeigt sich, daß diese bei einer erneuten Infektion des gleichen Bakterienstammes nunmehr in der Lage sind, sich ungehindert zu vermehren. Der erste Wirt hat die DNS der Phagennachkommen vor der Restriktion durch den zweiten Wirt geschützt. Diese Erscheinung wird Modifikation genannt. Die wenigen Phagen-DNS-Moleküle, die der Restriktion entgehen, ebenso deren Replikationsprodukte, profitieren von der für das Bakterium selbst lebensnotwendigen Fähigkeit, die eigene DNS vor einem Zerschneiden durch die gegen fremde DNS gerichteten Enzyme zu schützen. Die Phagen-DNS wird wie zelleigene DNS modifiziert, wodurch sie für die Restriktion durch diesen Wirt unangreifbar wird.

Modifikations- und Restriktionsenzyme erkennen bestimmte, durch eine spezifische Basensequenz gekennzeichnete Stellen auf der DNS. In rivalisierender Weise werden diese Erkennungssequenzen entweder durch ein Restriktionsenzym geschnitten, oder durch die Modifikation einer Base innerhalb der Erkennungssequenz geschützt. Die extreme Dominanz der Restriktion erklärt sich neben anderen Gründen dadurch, daß für eine aus-

reichende Modifikation alle Angriffspunkte auf der DNS geschützt sein müssen. Restriktion ist dagegen schon durch einen Schnitt an einem einzigen Punkt der DNS möglich.

Besonders wirkungsvoll wird der Kampf gegen fremde DNS durch die Evolution verschiedener, für jeden Stamm spezifischer Erkennungssequenzen. Eine für den Wirt A charakteristisch modifizierte DNS erscheint einem Wirt B unmodifiziert, da das Restriktionsenzym des Wirtes B eine andere als die modifizierte Basensequenz als spezifische Schnittstelle erkennt.

Das mikrobiologische Arbeiten mit einem Phagen-Bakterien-System erwies sich als optimal für die Untersuchungen dieses Phänomens. Erstens sind schnell große, homogene Populationen sowohl der Phagen als auch der Bakterien zu erhalten und zweitens lassen sich modifizierte und unmodifizierte Phagen auf einfache und schnelle Weise durch einen Vergleich der Phagenvermehrung auf einem restringierenden und einem nicht-restringierenden Wirt bestimmen.

Die Erscheinung der Restriktion-Modifikation wurde zuerst beobachtet von Luria und Human (1952) an dem Phagen T2 und seinem Wirt *Escherichia coli*, weiter von Anderson und Felix (1952) an dem Phagen ViII und seinem Wirt *Salmonella typhi*, von Bertani und Weigle (1953) am Phagen Lambda und den Wirten *E.coli*B und *Shigella dysenteriae*, sowie von Ralston und Krueger (1952) an einem Phagen P1 und dem Wirt *Staphylococcus aureus*. Bis heute wurden eine große Anzahl von Restriktions-Modifikations-Systemen beschrieben. Dieses Phänomen scheint, von wenigen Ausnahmen abgesehen, ein bei Bakterien allgemein vorhandenes Abwehrsystem gegen fremde DNS zu sein.

Arber und Dussoix (1962) und Dussoix und Arber (1962) beschrieben als erste die molekularen Grundlagen, insbesondere die Wirkung von Restriktion und Modifikation direkt an der DNS, und eine Reihe von neuen Aspekten dieses Systems am Beispiel von E.coli und den Phagen Lambda und P1. Die erwähnten Autoren konnten zeigen, daß der Ausschluß von Phagen durch eine Degradierung von  $^{32}\text{P}$ -markierter DNS eines unmodifizierten Lambda-Phagen in einem restringierenden Wirt nach erfolgreicher DNS-Injektion erfolgt. Reduzierte Adsorptionsfähigkeit der Phagen wurde somit ausgeschlossen. Gleiche Ergebnisse erhielten Lederberg und Meselson (1964), Uetake et al. (1964), Hattman (1964) und Fukasawa (1964).

1953 bewiesen Bertani und Weigle, daß es sich bei der Modifikation von Phagen um ein nichtmutierbares, unvererbbares Phänomen handelt. In einem bestimmten Wirt neu synthetisierte DNS trägt das für diesen Wirt spezifische Muster der Modifikation. Sowohl replizierende als auch nichtreplizierte DNS wird modifiziert (Lederberg und Meselson, 1964). Zum Schutz der DNS scheint es zu genügen, wenn nur ein DNS-Strang modifiziert ist (Arber und Dussoix, 1962). 1965 untersuchten Arber und Dussoix den molekularen Mechanismus der Modifikation. In Anlehnung an Befunde von Gold et al. (1964), die Untersuchungen über die nachträgliche Methylierung von DNS durchgeführt hatten, konnten die Autoren wahrscheinlich machen, daß DNS durch Methylierung modifiziert wird. Auch bei anderen Modifikationssystemen konnte gezeigt werden, daß es sich um eine Methylierung bestimmter Basen handelt. 1976 wiesen Hattman et al. beispielsweise nach, daß das von Colson und v. Pel (1974) beschriebene SA-Modifikationssystem in Salmonella typhimurium auf einer Methylierung von Adenin basiert. Eine Ausnahme stellt die DNS der E.coli-Phagen T2, T4 und T6 dar. Sie wird durch Glukosylierung der ungewöhn-

lichen Base Hydroxymethylcytosin modifiziert (Hattman und Fukasawa, 1963).

Arber und Dussoix (1962) beobachteten weiter, daß nicht nur Bakterien eine restriktive Wirkung ausüben können, sondern auch zum Beispiel der Phage P1. Nach Wachstum des Phagen Lambda auf dem E.coli-Stamm K12 wird bei einer anschließenden Infektion des gleichen Stammes mit diesem Phagen, der nun die K12-spezifische Modifikation trägt, doch von 100.000 Phagen nur jeder zweite vermehrt, wenn dieser Stamm den Phagen P1 als Prophagen trägt. Ist dieser Stamm nicht für P1 lysogen, akzeptiert er denselben Phagen ohne jede Restriktion. Korrespondierend zu seinem Restriktionsenzym codiert P1 auch für ein modifizierendes Enzym. Glover et al. beschrieben 1963 als erste diese phagengesteuerte Modifikation. Auch verschiedene Episome, die Resistenzgene gegen Antibiotika tragen, sogenannte R-Faktoren, sind mit eigenen Restriktions- und Modifikationsgenen ausgestattet (Arber und Linn, 1969).

1965 erläutert Arber in einem Übersichtsartikel weitere Aspekte von RM-Systemen. Nicht nur die DNS von Phagen wird restringiert. Auch unmodifizierte bakterielle DNS, die entweder über Transduktion, F-Duktion oder Chromosomentransfer in eine restringierende Zelle gelangt, kann der Restriktion ausgesetzt sein. Ebenso werden transferierbare Episome wie F-Faktoren, Resistenzfaktoren und colicinogene Faktoren in restriktiven Empfängerzellen zerstört. Arber und Morse (1965), Trautner et al. (1974) und Ehrlich et al. (1976) beobachteten ebenfalls Restriktion bei Transfektion. Trautner et al. (1974) berichten weiter, daß transformierte DNS nicht angegriffen wird. Möglicherweise ist die bei der Transformation postulierte, vorübergehende Einsträngigkeit der DNS nach der Auf-

nahme in die Empfängerzelle für die Immunität gegen Restriktion verantwortlich. Bezüglich der Struktur der DNS wurde nämlich lange Jahre die Beobachtung gemacht, daß einsträngige DNS nicht restringiert wird. DNS von Einzelstrangphagen, wie zum Beispiel M13 oder ØX174, wurden nur in ihrer replikativen Form als Doppelstrang restringiert (Godson, 1973). 1975 konnten jedoch sowohl die Autoren Horiuchi und Zinder als auch Blakesley und Wells beobachten, daß bestimmte Restriktionsenzyme einzelsträngige DNS ebensogut schneiden wie doppelsträngige DNS. Diese Ergebnisse bestätigen Godson und Roberts (1976), die bei mindestens acht Restriktionsenzymen Einzelstrangrestriktion fanden.

Bezüglich der Schneidekinetik machten Meselson und Yuan (1968) die Beobachtung, daß erst ein Strang geschnitten wird, und nach wenigen Sekunden der komplementäre Strang. Nach dieser spezifischen Restriktion wird die DNS durch unspezifische Nucleasen weiter degradiert (Dussoix und Arber, 1962).

Auf der Suche nach der genetischen Basis für Modifikations- und Restriktionsaktivitäten isolierten Arber und Linn (1969) Mutanten, die keine Restriktion mehr zeigten, und solche, die weder restringieren noch modifizieren konnten. Mutanten, die nicht mehr modifizieren, dagegen restringieren konnten, wurden nicht gefunden. Die Ursache hierfür liegt mit größter Wahrscheinlichkeit darin, daß Mutanten dieses Genotyps durch Zerstörung ihrer eigenen DNS nicht lebensfähig sind. Durch Komplementationsexperimente mit derartigen Mutanten konnten die Autoren Boyer und Roulland-Dussoix (1969) und Hubacek und Glover (1970) im Falle eines "hs" genannten RM-Systems bei E.coli drei Cistrons finden, die für drei diffusable Genprodukte codieren: Proteine für Restriktion, Modi-

fikation und Spezifität der Erkennungssequenz. Sie nannten diese Gene hsr, hsm und hss. Das hsr-Gen ist verantwortlich für die Produktion der restringierenden Endonuclease, des Restriktionsenzym; bei Ausfall des hsm-Gens kann keine Modifikation beobachtet werden. Boyer und Roulland-Dussoix (1969) hatten beobachtet, daß bei einer mutativen Veränderung des hss-Gens immer der Phänotyp  $r^{-}m^{-}$  auftrat. Die Autoren schlossen daraus, daß das hss-Gen für ein Produkt codiert, das für die Erkennung der für Restriktion und Modifikation spezifischen Basensequenz verantwortlich ist, und daß die hsr- und hsm-Genprodukte nur in Verbindung mit diesem Protein restringieren oder methylieren können. Die drei sehr nahe beieinanderliegenden Cistrons des "K"-Systems von E.coli wurden von Colson et al. 1965 kartiert. Sie befinden sich eine Zeiteinheit entgegen dem Uhrzeigersinn vom Marker thr auf dem E.coli-Chromosom. 1970 kartierten Colson, Colson und v.Pel die 1969 von diesen Autoren entdeckten Gene für ein "LT" genanntes RM-System bei Salmonella typhimurium. Auch hier zeigte sich eine enge lokale Verbindung der drei Cistrons. Sie kartieren in der Nähe des Markers proC. 1971 entdeckten Colson und Colson ein zweites Restriktionssystem in S.typhimurium, das "S"-System genannt wurde, und das an der gleichen Stelle auf dem S.typhimurium-Chromosom kartierte wie das K-System bei E.coli. 1974 zeigten die Autoren Colson und v.Pel, daß das S-System in die eng benachbarten Systeme SA und SB differenziert werden kann. Dabei konnten v.Pel und Colson (1974) durch Komplementationsversuche zeigen, daß das SB-System in S.typhimurium den Systemen K und B in E.coli homolog ist. Sie kartieren zwischen den Markern pyr und ser. 1975 entdeckten Bullas und Colson mehrere RM-Systeme in verschiedenen Salmonellastämmen, und 1976 gelang Bullas et al. die Konstruktion eines neuen Systems durch Rekombination zweier bekannter Systeme.

Es war nun von großem Interesse, die für Restriktion und Modifikation verantwortlichen Proteine zu isolieren und ihre charakteristischen Eigenschaften zu untersuchen. Es ist allgemein üblich, von diesen Proteinen als Restriktions- und Modifikationsenzymen zu sprechen. Die Korrektheit dieser Bezeichnung wird von Kornberg (1974) kritisch beurteilt, da es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen war, ob diese Proteine mehr als einen Schnitt oder eine Methylierung durchführen und somit die Bezeichnung "Enzym" zu Recht trügen.

Restriktionsendonucleasen wurden zuerst isoliert und sind insgesamt besser untersucht als die methylierenden Enzyme. Gründe dafür sind in der leichteren Meßbarkeit ihrer Aktivität zu suchen, ebenso erschienen sie wegen ihrer drei verschiedenen Funktionen sehr interessant: Sie erkennen eine spezifische Basensequenz auf der DNS und sie beurteilen, ob eine Base in der Sequenz modifiziert ist. Fehlt die Modifikation, wird ein endonucleatischer Schnitt ausgeführt.

Seit der ersten Isolierung und Reinigung eines Restriktionsenzymes durch Meselson und Yuan (1968) aus dem Stamm K12 von E.coli, sind bis heute über 30 Restriktionsenzyme isoliert worden. Soweit ersichtlich, lassen sie sich in zwei Gruppen einteilen:

In einen komplizierteren Typ I und einen einfachen Typ II. Endonucleasen vom Typ I sind komplexe Enzyme mit drei verschiedenen Untereinheiten. Sie benötigen S-Adenosylmethionin, ATP und  $Mg^{++}$ . Sie erkennen eine bestimmte Basensequenz als Bindungsstelle auf der DNS, wandern dann jedoch auf dem Strang entlang, um an einer von der Erkennungssequenz ver-

schiedenen Stelle zu schneiden. Brack et al. war es 1976 möglich, mit Hilfe elektronenmikroskopischer und biochemischer Methoden die Erkennungssequenzen für eine Restriktionsnuclease des Typs I aus dem Stamm K12 von E.coli zu kartieren. Bisher sind nur wenig Enzyme dieses Typs bekannt, beispielsweise aus dem E.coli-Stamm B und ein vom Phagen P1 codiertes Enzym, ebenso eine Nuclease aus dem Stamm Haemophilus influenzae. Meselson et al. (1972) beobachteten bei den Typ I-Nucleasen von E.coli K und dem Phagen P1, daß diese Enzyme zusätzlich zu ihrer restriktiven Wirkung auch modifizieren.

Der größte Teil aller isolierten Enzyme gehört dem Typ II an. Enzyme dieser Gruppe sind einfacher gebaut. Sie benötigen als Co-Faktor lediglich  $Mg^{++}$ . Die für die DNS-Bindung nötige, spezifische Basensequenz ist gleichzeitig der Schneideort für dieses Enzym und Erkennungsregion und Substrat für das Modifikationsenzym. Die DNS wird in vielen Fällen an nicht genau gegenüberliegenden Stellen der Doppelstränge geschnitten, so daß überstehende, cohäsive Enden entstehen. Um die verschiedenen Restriktionsenzyme eindeutig ansprechen zu können, wurde von Smith und Nathan (1973) eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen, die seither allgemein benutzt wird.

Auch Methylierungsenzyme wurden isoliert und untersucht. Sie benötigen S-Adenosylmethionin als Methyl-Spender und DNS als Akzeptor. Diese Erkenntnisse gewannen Kühnlein et al. (1969), Lautenberger und Linn (1972) und Smith et al. (1972) an einer Methylase aus dem Stamm E.coli B. Insgesamt sind jedoch die Methylasen weit schlechter untersucht als die restringierenden Endonucleasen.

1970 veröffentlichten Kelly und Smith zum erstenmal eine Arbeit über die genaue Basensequenz, die das Restriktionsenzym HindI, eine Nuclease vom Typ II, als Erkennungsregion für das Schneiden und Methylieren der DNS benötigt. Durch schrittweisen, enzymatischen Abbau der Nucleotide, die an all den durch die Schnitte des Enzyms entstandenen offenen DNS-Enden identisch auftauchen, konnten die Autoren zeigen, daß immer fünf gleiche Basen erkannt werden. Alle Erkennungssequenzen sind doppelt rotationssymmetrisch. Kelly und Smith (1970) stellten deshalb Vermutungen über die symmetrische Struktur von Restriktionsenzymen an. Diese Hypothese wurde von einer Reihe von Autoren bestätigt (Hedgpeth et al. 1972, Merz und Davis 1972, Bigger et al. 1973, Boyer et al. 1973).

Die explosive Entwicklung bei der Isolierung von Restriktionsenzymen hängt mit der besonderen Verwendbarkeit dieser Enzyme zusammen. Die basensequenzspezifische Schneideaktivität dieser Nucleasen erinnert an die analogen spezifischen proteolytischen Enzyme wie Trypsin und Chymotrypsin, mit deren Hilfe Aminosäuresequenzanalysen durchgeführt werden. Die zusätzliche Eigenschaft vieler Restriktionsenzyme, an allen Schnittstellen gleichartige, sogenannte "sticky ends", also komplementäre, überstehende Einzelstrangenden zu produzieren, macht diese Enzyme zu einem handlichen Werkzeug, zum Beispiel für die Sequenzanalyse von DNS-Fragmenten, die physikalische Kartierung und Klärung von Verwandtschaften bestimmter Genome, ganz besonders aber für die Verknüpfung von DNS-Fragmenten verschiedener Herkunft.

Durch diese spezifischen Fähigkeiten der Restriktionsenzyme wurden sehr plötzlich der "genetic engineering" genannten Genmanipulation Möglichkeiten eröffnet, die aus verschiedenen Gründen bedenklich erscheinen. Dabei wird vor allem das

Schneiden und Verknüpfen von DNS menschenpathogener Organismen oder multiple Resistenzen tragender DNS-Faktoren als riskant angesehen.

## 2. Entdeckung einer Restriktions-Modifikationsmutante durch die Isolierung einer Transduktionsspendermutante

Schmieger (1971b, 1972) isolierte und beschrieb Mutanten des allgemein transduzierenden Phagen P22, einem Phagen des Bakterienstammes *Salmonella typhimurium*, die entweder eine erhöhte Transduktionshäufigkeit zeigten, sogenannte HT-Mutanten, oder solche, die nur noch in vermindertem Umfang zu transduzieren in der Lage waren, sogenannte NT-Mutanten. Da keine Phagenmutanten gefunden werden konnten, deren Fähigkeit zur Transduktion, also der Übertragung bakterieller Gene von einem Spenderbakterium auf ein Empfängerbakterium mittels eines Phagen (Zinder und Lederberg, 1952) völlig verlorengegangen war, wurde auch eine Beteiligung des Spenderbakteriums an der Bildung transduzierender Partikel vermutet. Wäre diese Hypothese richtig, müßten sich Spendermutanten isolieren lassen, in denen eine verringerte Zahl von transduzierenden Partikeln gebildet würde. Die Isolierung solcher bakterieller Mutanten, die wegen ihrer phänotypischen Eigenschaft, schlechte Spender für Transduktionen zu sein, "LD = low donor capacity" genannt wurden, gelang. Sie wurden von v. Lieres (1974) isoliert und untersucht. Sie verglich mit Hilfe differenzieller radioaktiver Markierung den Anteil transduzierender Partikel, der in den Mutanten gebildet wurde, mit dem Anteil, den ein Wildtypspender produziert. Die Ergebnisse zeigten, daß der Grund für die reduzierte Zahl von transduzierenden Partikeln nicht in einer verminderten Produktion dieser Partikel zu suchen war. Als Hypothese blieb die Vermutung, daß es sich bei den

LD-Mutanten um Modifikations- und damit auch Restriktionsmutanten handelt, deren nunmehr unmodifizierte DNS in einem Empfänger mit wirksamer Restriktion degradiert wird.

Aufgabe dieser Arbeit war es nun erstens nachzuweisen, daß es sich bei dem beobachteten Phänomen tatsächlich um die Wirkung eines RM-Systems handelt, zweitens einige Aspekte dieses Systems zu untersuchen, drittens dieses System mit den bekannten RM-Systemen in *Salmonella typhimurium* zu vergleichen (Colson, Colson und v.Pel; 1969, Colson und v.Pel, 1974) und, falls es sich nicht um ein neues System handeln sollte, zu identifizieren.

Weiter wurde die von v. Lieres (1974) beobachtete Fähigkeit des Phagen P22 untersucht, das hier postulierte RM-System zu unterlaufen.

# B. MATERIAL UND METHODEN

## 1. Material

### 1.1. Bakterienstämme

#### 1.1.1. Salmonella typhimurium

| <u>Bezeichnung</u>     | <u>Genotyp, Beschreibung</u>                                                                                     | <u>Herkunft</u> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| LT-2                   | Wildtyp                                                                                                          | dieses Labor    |
| His                    | <u>hisB22</u><br>auxotroph für Histidin                                                                          | "               |
| T4/2                   | NG- (vgl. Material 1.3.15.)<br>induzierte Mutante von LT-2;<br>auxotroph für Thymin/Thymidin                     | "               |
| LD10                   | NG-induzierte Mutante von LT-2<br>mit reduzierter Transduktions-<br>häufigkeit                                   | "               |
| LD10 his               | NG-induzierte Mutante von LD10;<br>auxotroph für Histidin                                                        | "               |
| LD1.1                  | NG-induzierte Mutante von T4/2<br>mit reduzierter Transduktions-<br>häufigkeit;<br>auxotroph für Thymin/Thymidin | "               |
| LD1.1 thy <sup>+</sup> | LD1.1; nicht mehr auxotroph<br>für Thymin/Thymidin durch<br>Transduktion                                         | "               |
| LD10 Str <sup>r</sup>  | Spontan entstandene streptomycinresistente Mutante von LD10                                                      | "               |

| <u>Bezeichnung</u>    | <u>Genotyp, Beschreibung</u>                                                                                                                                                                                                                                | <u>Herkunft</u> |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| F'lac LD10            | LD10, der durch F-Duktion ein F'-Episom mit dem Operon für Laktoseabbau erhalten hat                                                                                                                                                                        | dieses Labor    |
| LT-2 Str <sup>r</sup> | Spontan entstandene streptomycinresistente Mutante von LT-2                                                                                                                                                                                                 | "               |
| F'lac LT-2            | LT-2, der durch F-Duktion ein F'-Episom mit dem Operon für Laktoseabbau erhalten hat                                                                                                                                                                        | "               |
| SA 4                  | <u>leu A124</u> , <u>ara B9</u><br>auxotroph für Leucin,<br>kein Arabinoseabbau                                                                                                                                                                             | K.E.Sanderson   |
| SU 687                | <u>trp A52</u> , <u>cys B12</u> , <u>pyr F146</u><br>auxotroph für Tryptophan<br>Cystein, Pyrimidin                                                                                                                                                         | "               |
| SA 1134               | <u>phe-47</u> , <u>met A22</u> , <u>trp B2</u> ,<br><u>his F1009</u> , <u>xyl-1</u> , <u>str A201</u><br>auxotroph für Phenylalanin,<br>Methionin, Tryptophan, Histidin,<br>kein Xyloseabbau, streptomycin-<br>resistent                                    | "               |
| SA 1145               | <u>pro AB391</u> , <u>met A22</u> , <u>trp B2</u> ,<br><u>his F1009</u> , <u>xyl-1</u> , <u>ilv A99</u> ,<br><u>str A201</u><br>auxotroph für Prolin, Methionin,<br>Tryptophan, Histidin, Isoleucin,<br>Valin, kein Xyloseabbau, strepto-<br>mycinresistent | "               |

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Genotyp, Beschreibung</u>                                                                               | <u>Herkunft</u> |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| SR 315             | <u>FS21 Hfr, leu-256</u><br>Hfr-Stamm; auxotroph für Leucin                                                | K.E.Sanderson   |
| SR 305             | <u>HfrA, his D23, gal-50</u><br>Hfr-Stamm; auxotroph für Histidin,<br>kein Galaktoseabbau                  | "               |
| SA 722             | <u>Hfr K10, ser A15, pur-268</u><br>Hfr-Stamm; auxotroph für Serin,<br>Purin                               | "               |
| SA 607             | <u>ser A15, F'</u><br>Stamm mit F-Epison; auxotroph<br>für Serin                                           | "               |
| SA 624             | <u>cys E1709, xyl-3, pyr E125</u><br>auxotroph für Cystein, Pyrimidin<br>kein Xyloseabbau                  | "               |
| SU 418             | <u>Hfr B2, pro A26</u><br>Hfr-Stamm; auxotroph für Prolin                                                  | "               |
| SB 109             | <u>met E338, ilv C401, ara-9</u><br>auxotroph für Methionin,<br>Isoleucin, Valin, kein Ara-<br>binoseabbau | P.E.Hartmann    |
| SH 480 (sie1)      | <u>pyr B96</u><br>auxotroph für Pyrimidin<br>sie1-lysogen                                                  | K.E.Sanderson   |

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Genotyp, Beschreibung</u>                                                                                                                                                                                                                                                                        | <u>Herkunft</u> |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 4423               | <u>r<sup>-</sup>SA m<sup>-</sup>SA, pro C90, str<sup>r</sup></u><br>defekt in den Genen für Restriktion und Modifikation des SA-Systems, auxotroph für Prolin, streptomycinresistent                                                                                                                | C.Colson        |
| 4420               | <u>r<sup>-</sup>SA m<sup>-</sup>SA, met A, trp-2, str A, xyl-1 "</u><br>defekt in den Genen für Restriktion und Modifikation des SA-Systems, auxotroph für Methionin, Tryptophan, kein Xyloseabbau, streptomycinresistent, abgeleitet vom Stamm SL1027 (B.Stocker), daher frei vom Prophagen Fels 2 |                 |
| SU 70              | <u>Su<sup>+</sup></u><br>amber-Suppressor; revertierte NG-induzierte Cystein-amber-Mutante des LT-2                                                                                                                                                                                                 | dieses Labor    |
| SU 70(L)           | Wie SU 70, L-lysogen                                                                                                                                                                                                                                                                                | "               |
| SU 70(sie1)        | Wie SU 70, sie1-lysogen                                                                                                                                                                                                                                                                             | "               |

Nahezu alle Stämme, die bei Transduktionen als Empfänger eingesetzt wurden, sind P22-lysogen. Sie sind im Text durch den in Klammern hinter der Stammbezeichnung genannten Phagnamen gekennzeichnet, also z.B. His (P22) für den P22-lysogenen Stamm His.

#### 1.1.2. Escherichia coli

|        |                                                                                                                                                                         |                                 |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| W 3747 | <u>met-21, lac, F'lac</u><br>auxotroph für Methionin, defekt im chromosomalen Gen für Laktoseabbau; enthält ein substituiertes F-Epison mit dem Operon für Laktoseabbau | Fr.Heinerich<br>dieses Institut |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|

1.2. Bakteriophagen

1.2.1. Phagen von Salmonella typhimurium

| <u>Bezeichnung</u>             | <u>Beschreibung</u>                                                                                                             | <u>Herkunft</u> |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| H1                             | P22c <sup>+</sup> ; Wildtyp                                                                                                     | dieses Labor    |
| H5                             | P22c <sub>2</sub> ; Klarplaquemutante<br>mit defektem Repressor                                                                 | "               |
| HT 13/4                        | NG-induzierte Mutante von H5<br>mit erhöhter Transduktions-<br>häufigkeit (Schmieger, 1971b)                                    | "               |
| mod 9                          | NG-induzierte Mutante von H5<br>mit erhöhter Empfindlichkeit<br>für SA-Restriktion                                              | "               |
| mod 43                         | NG-induzierte Mutante von mod 9<br>mit erhöhter Empfindlichkeit<br>für SA-Restriktion                                           | "               |
| Px <sub>1</sub> c <sub>2</sub> | Aus Rekombination<br>zwischen P22 und dem Salmonella-<br>prophagen Py entstandener Phage<br>(Prell, 1970 a,b) Klarplaquemutante | K. Prell        |
| KB1                            | Wildtyp<br>(Boro und Brenchley, 1971)                                                                                           | B. Stocker      |
| KB1 int                        | Integrationsmutante von KB1                                                                                                     | "               |
| LP7                            | Wildtyp                                                                                                                         | "               |

| <u>Bezeichnung</u>   | <u>Beschreibung</u>                                                                                             | <u>Herkunft</u> |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| A1a                  | Wildtyp (Boyd und Bidwell, 1957)                                                                                | B. Stocker      |
| A3                   | Wildtyp (Boyd und Bidwell, 1957)                                                                                | "               |
| L                    | Wildtyp (Bezdek und Amati, 1967)                                                                                | "               |
| ES 18 h <sub>1</sub> | Hostrange-Mutante des<br>Phagen ES 18, dieser ist<br>abgeleitet vom Phagen 18<br>(Kuo und Stocker, 1970)        | "               |
| FO                   | Wildtyp<br>(Felix und Callow, 1943)                                                                             | "               |
| 9NA                  | Wildtyp (Wilkinson, Gemski<br>und Stocker, 1972)                                                                | "               |
| SP                   | Wildtyp (Zinder, 1961)                                                                                          | "               |
| am 2/13              | Amber-Doppel-Mutante in den<br>Genen 2 und 13, hervorgegangen<br>durch Kreuzung der amber-<br>Mutanten 2 und 13 | dieses Labor    |
| am 8/13              | Amber-Doppel-Mutante in den<br>Genen 8 und 13, hervorgegangen<br>durch Kreuzung der amber-<br>Mutanten 8 und 13 | "               |
| am 80c <sub>2</sub>  | Amber-Mutante im Gen 12,<br>defekt im Gen c <sub>2</sub>                                                        | H. Smith        |

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Beschreibung</u>                                                                                                                               | <u>Herkunft</u> |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| am 3               | Amber-Mutante im Gen 3                                                                                                                            | D. Botstein     |
| am 9               | Amber-Mutante im Gen 9,<br>defekt im Gen $m_3$ und den<br>Genen sieA und sieB                                                                     | "               |
| am 100             | Amber-Mutante im Gen 18                                                                                                                           | "               |
| am 19              | Amber-Mutante im Gen 19                                                                                                                           | "               |
| am 23              | Amber-Mutante im Gen 23                                                                                                                           | "               |
| sie1 ts            | sie1 ts12.1 ts2.1<br>Defekt in den Genen sieA<br>und sieB; temperatursensitiv;<br>hervorgegangen aus dem lysogenen<br>Stamm Nr. 210 von M. Levine | dieses Labor    |

### 1.2.2. Phagen von Escherichia coli

|    |         |                                   |
|----|---------|-----------------------------------|
| T1 | Wildtyp | Fr. Heinerich,<br>dieses Institut |
|----|---------|-----------------------------------|

### 1.3. Medien, Lösungen, Chemikalien

|                   |                                                                               |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1.3.1. NB-Medium  | 8g Bacto-Nutrient-Broth<br>5g NaCl<br>1000 ml entionisiertes H <sub>2</sub> O |
| 1.3.2. NB-Platten | NB-Medium + 1,5% Agar                                                         |

- 1.3.3. Weichagar NB-Medium + 0,7% Agar
- 1.3.4. Pen-Medium 17,5g Bacto-Pennassay Broth  
(=Antibiotic 1000 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O  
Medium 3)
- 1.3.5. M9-Minimal-Platten 15g Difco-Agar  
880 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O

Nach dem Autoklavieren werden dazugegeben:

100 ml 10 x M9-Salze (vgl. 1.3.8.)

10 ml MgSO<sub>4</sub>-Lösung; 0,1 M

10 ml Glukoselösung 20%ig, oder

Arabinoselösung 20%ig, oder

Laktoselösung 20%ig

Nach Bedarf werden folgende Substanzen dazugegeben:  
Streptomycin, 20 µg/ml oder 600 µg/ml Endkonzentra-  
tion (vgl. Methoden 2.13.)

| Thymidin, 20 µg/ml       | Endkonzentration |
|--------------------------|------------------|
| Uridin, 40 µg/ml         | "                |
| L-Cystein, 100 µg/ml     | "                |
| L-Histidin, 20 µg/ml     | "                |
| L-Isoleucin, 20 µg/ml    | "                |
| L-Leucin, 20 µg/ml       | "                |
| L-Methionin, 20 µg/ml    | "                |
| L-Phenylalanin, 20 µg/ml | "                |
| L-Prolin, 20 µg/ml       | "                |
| L-Serin, 20 µg/ml        | "                |
| L-Tryptophan, 20 µg/ml   | "                |
| L-Valin, 20 µg/ml        | "                |

1.3.6. TCG-Medium (Kozinski und Szybalski, 1959)

1,0 ml Difco casamino acid  
2,0 ml Glukose-Lösung, 20%ig  
0,2 ml NaCl-Lösung, 25%ig  
0,16 ml  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung; 0,1 M  
0,32 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung; 0,1 M  
0,1 ml  $\text{MgSO}_4$ -Lösung; 0,1 M  
0,14 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung; 1M  
0,03 ml  $\text{FeCl}_3$ -Lösung; 0,01 M  
100 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,4; 0,1 M (vgl. 1.3.9.)  
Zugabe von Nucleotiden für die Markierung von Phagen-  
DNS nach Bedarf (vgl. Meth. 2.14. und 2.15.)

1.3.7. Verdünnungsflüssigkeit

1g Trypton  
5g NaCl  
1000 ml entionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$

1.3.8. 10 x M9-Salze

150g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$   
30g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
5g NaCl  
10g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
aufgefüllt auf 1000 ml mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$

1.3.9. Tris-HCl-Puffer

Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan, 1M  
mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

1.3.10. M9-Puffer

15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  x 12  $\text{H}_2\text{O}$   
3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
5g  $\text{NaCl}$   
1ml  $\text{MgSO}_4$ -Lösung, 1M  
1000 ml entionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$

1.3.11. SSC-Puffer

gleiche Mengen von:  
 $\text{NaCl}$ -Lösung 0,15 M  
 $\text{Na-Citrat}$ -Lösung 0,015 M

1.3.12. Lysis-Mischung (Botstein, 1968)

1 ml  $\text{Tris-HCl}$ -Lösung pH 8,0; 1M  
2 ml  $\text{EDTA}$ -Lösung pH 8,5; 0,5 M  
0,1 ml  $\text{KCN}$ -Lösung; 1M  
0,15 ml Lysozym (10 mg Lysozym / ml  $\text{Tris-HCl}$ -  
Lösung pH 8,0; 0,25 M)  
aufgefüllt auf 10 ml mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$

1.3.13. Neutrale Sucroslösung (Botstein, 1968)

5 oder 20 g Sucrose, für 5 oder 20%ige Lösung  
2 ml  $\text{Tris-HCl}$ -Lösung pH 8,0; 1M  
2 ml  $\text{EDTA}$ -Lösung pH 8,5; 0,5 M  
0,33 ml Sarkosyl NL 30  
aufgefüllt auf 100 ml mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$

1.3.14. Scintillationsflüssigkeit

5g PPO  
0,3 g dimethyl-POPOP  
1000 ml Toluol

1.3.15. Chemikalien

Caesiumchlorid, Reinheit 99,5 % (Merck, Darmstadt)  
Thymidin-6-<sup>3</sup>H, 5000 mCi/mmol  
(Amersham-Buchler, Braunschweig)  
Thymidin-2-<sup>14</sup>C, 50 mCi/mmol "  
Lysozym, 3 x krist. reinst, (Serva, Heidelberg)  
Phenol (Merck, Darmstadt)  
Sarkosyl NL 30 (Geigy, Basel)  
PPO; dimethyl-POPOP (Packard, Frankfurt)  
Toluol (Baker, Deventer)  
Glasfaserfilter (Schleicher und Schmitt, München)  
N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin = NG  
Aethylendiaminetetraacetic acid  
disodium salt = EDTA, Reinheit 99 % (Merck, Darm-  
stadt)

## 2. Methoden

### 2.1. Übernachtskulturen

5 ml NB-Medium werden mit 0,05 ml einer stationären Bakterien-Kultur angeimpft und bei 37°C im Rollbebrüter über Nacht bis zu einem Bakterientiter von ca.  $2 \times 10^9$  Zellen/ml inkubiert.

### 2.2. Phagenlysat

Eine stationäre Bakterienkultur wird in NB-Medium 1:1000 verdünnt und bei 37°C so lange im Mini-Shaker von Brauns-Melsungen geschüttelt, bis die Kultur eine Dichte von ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/ml erreicht hat. In dieser logarithmischen Wachstumsphase wird die Kultur mit Phagen beimpft, und zwar normalerweise mit einer Multiplizität von 5 Phagen pro Zelle, d.h. also mit einer  $moi = 5$ . Die infizierte Kultur wird bei gleicher Temperatur weitergeschüttelt, bis diese durch die Lyse der Bakterien klar wird, längstens jedoch für 2 Stunden. Zur Lyse und Abtötung restlicher Bakterienzellen wird die Kultur schließlich noch mit einigen Tropfen Chloroform, gegen das die Phagen resistent sind, ca. 10 Minuten lang geschüttelt. Durch 15 Minuten langes Zentrifugieren bei 5000 Upm wird das Lysat von Bakterienrückständen gereinigt. Die Phagen befinden sich im klaren Überstand. Um anzugeben, auf welchem Wirt ein Phage gewachsen ist, schreibt man ein Kürzel für den Wirt durch einen Doppelpunkt von der Phagenkurzbezeichnung getrennt, also z.B. H5:LT-2 für einen Phagen H5, der auf LT-2 gewachsen ist.

### 2.3. Konzentrieren und Reinigen von Phagenlysaten in CsCl-Stufengradienten

In einem 30 ml-Zentrifugenröhrchen werden 5 ml einer CsCl-Lösung der Dichte  $\rho = 1,6 \text{ gcm}^{-3}$  mit 7 ml einer CsCl-Lösung der Dichte  $\rho = 1,4 \text{ gcm}^{-3}$  so langsam überschichtet, daß nicht

durch Strömungswirbel lokale Vermischungen der beiden CsCl-Lösungen entstehen. Darüber wird ebenso vorsichtig das zu reinigende und konzentrierende Phagenlysate pipettiert. Um zu verhindern, daß ein nicht vollständig gefülltes Röhrchen bei der Zentrifugation kollabiert, wird bis knapp unter den Röhrchenrand flüssiges Paraffin überschichtet. Nach 90 Minuten Zentrifugation bei 23 000 Upm (= 75 000 x g am Röhrchenboden) und 5°C in der Beckmann-Ultrazentrifuge L2 im Schwingbecherrotor SW 25 bilden die Phagen, die eine Dichte von ca.  $\rho = 1,5 \text{ gcm}^{-3}$  haben, eine Bande zwischen den beiden CsCl-Lösungen. Diese wird durch Anstechen des Röhrchenbodens mit einer Kanüle in einen Dialyseschlauch übergeführt. Das CsCl wird durch Dialyse gegen 1/10 SSC (vgl. Material 1.3.11.) entfernt. Man erhält durch diese Methode ein bis zum 10-fachen konzentriertes Phagenlysate, das keine bakteriellen oder medienbedingten Verunreinigungen mehr enthält (Schmieger 1970).

#### 2.4. Bestimmen von Phagentitern

Ein Tropfen einer frischen Übernachtkultur des Stammes, auf dem die Phagen sich vermehrt haben, wird in 2,5 ml flüssigem Weichagar mit 0,1 ml einer geeigneten Verdünnung des zu titrierenden Phagenlysats gemischt und gleichmäßig über eine NB-Platte verteilt. Nach Bebrüten der Platte bei 37°C zeigt sich für jeden in der Verdünnung befindlichen aktiven Phagen ein Plaque. Nach Auszählen der Plaques kann über die verwendete Verdünnungsstufe auf den Titer des Phagenlysats zurückgerechnet werden.

#### 2.5. Bestimmen des eop-Wertes

Die "efficiency of plating" (= eop) wird durch Titrieren (vgl. 2.4.) eines Phagen auf verschiedenen Wirten gemessen.

Um zu prüfen, ob ein Phage modifiziert ist, bestimmt man die Titer dieses Phagen auf dem Wirt, auf dem er gewachsen ist und auf einem restringierendem Vergleichsstamm. Durch Division der Anzahl der Plaques auf diesem Stamm durch die Anzahl der Plaques, die auf dem ersten Stamm gewachsen sind, erhält man den eop-Wert, der ein Maß für die Restriktion darstellt. Bei ungehinderter Vermehrung erhält man also beispielsweise einen eop-Wert von 1.

## 2.6. Lysogenisieren der Bakterienstämme

Um Bakterienstämme zu erhalten, die einen Prophagen tragen, tropft man auf eine mit dem zu lysogenisierenden Stamm im Weichagar vorplattierte Platte einen Tropfen des Phagen, mit dem lysogenisiert werden soll. Nach Inkubation bei 37°C zeigt sich im Bakterienrasen ein lysogenisierte Bakterien enthaltendes Tropfareal. Man impft aus diesem Gebiet eine Probe ab und streicht sie auf NB-Platten zu Einzelkolonien aus. Nach wiederholtem Abimpfen und Ausstreichen der Zellen zum Zwecke der Reinigung werden diese auf ihre Lysogenie getestet.

## 2.7. Lysogenietest

Zunächst testet man, ob die Zellen gegen den Phagen immun sind, mit dem lysogenisiert wurde. Dazu wird der Phage auf eine mit dem zu testenden Stamm in Weichagar vorplattierte NB-Platte getropft. Bei Immunität zeigt sich keine Lyse.

Um zu testen, ob der Prophage in der Zelle intakt ist, wird überprüft, ob die Zelle noch funktionsfähige Phagen freisetzen kann, wie das bei einer wachsenden lysogenen Bakterienkultur immer zu beobachten ist. Die in den lytischen Zyklus

übergehenden Phagen lassen sich durch Auftropfen des zu testenden lysogenen Stammes auf einen in Weichagar vorplattierten LT-2 nachweisen. Falls der Phage intakt war, bildet sich ein Lysisareal.

## 2.8. Transduktion

Bei der Transduktion sind drei Faktoren beteiligt: Ein bakterieller Spender, ein bakterieller Empfänger und ein Phage, der Gene vom Spender auf den Empfänger übertragen kann. Als Vorbereitung für die Transduktion wird ein Phagenlysat auf dem Spender gezogen. Im allgemeinen wird dazu eine Klarplaquemutante des Phagen P22 verwendet, die die Fähigkeit zu lysogenisieren verloren hat. Dieses Phagenlysat enthält neben infektiösen Phagen = i.p. Partikel, deren Köpfe mit bakterieller DNS gefüllt sind, die sogenannten transduzierenden Partikel = t.p. Für die Übertragung der bakteriellen Gene des Spenders durch den Phagen, wird nun mit diesem LySAT ein Empfänger infiziert. Dieser muß zwei Bedingungen erfüllen: Einmal muß er eine Auxotrophie tragen, damit die Übertragung bakterieller DNS gemessen werden kann, zum anderen muß er wegen der Anwendung eines Klarplaquephagen, der nur noch lysieren kann, zum Schutz der entstandenen rekombinativen Transduktanten einen Prophagen der gleichen Phagenart tragen. Dieser synthetisiert konstitutiv einen Repressor, der die Expression der Genome erneut infizierender Phagen verhindert. Transduktanten können somit nicht nachträglich lysiert werden.

Man mischt eine Übernachtskultur eines Empfängers mit einem Phagenlysat so, daß maximal 10 Phagen eine Zelle infizieren ( $\text{moi} = 10$ ). Nach 10-minütiger, unbelüfteter Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad wird die Infektion in Eis gestoppt. Das Gemisch wird unverdünnt oder in geeigneter Verdünnung

auf Minimalplatten plattiert und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die durch rekombinative Transduktanten gebildeten Kolonien können dann ausgezählt werden.

## 2.9. Berechnung des T/F-Wertes

Der T/P-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der unter einer gegebenen Zahl von infizierenden Partikeln (= i.p.) Transduktanten zu finden sind. Sie wird bestimmt aus dem Verhältnis der rekombinativen Transduktanten zu den infizierenden Partikeln.

## 2.10. Transduktion mit alysogenem Empfänger

Soll die Transduktion mit einem Empfänger durchgeführt werden, der keinen Prophagen trägt, müssen zur Verhinderung der nachträglichen Lyse der rekombinativen Transduktanten durch überinfizierende Phagen die Versuchsbedingungen geändert werden. Um zu gewährleisten, daß jede Zelle nur mit maximal einem Phagen infiziert wird, wurde die  $m_{oi}$  nach Berechnung durch die Formel von Poisson (Poisson, 1837) auf 0,05 herabgesetzt.

Nach einer Adsorptionszeit von 5 Minuten wird das Transduktionsgemisch ohne vorheriges Stoppen in Eis sofort unverdünnt auf M9-Glasplatten plattiert, die auf 42°C vorgewärmt waren. Nach 2 Tagen Inkubation bei 42°C können die aus rekombinativen Transduktanten entstandenen Kolonien ausgezählt werden.

## 2.11. Cotransduktion

Eng benachbarte Gene des Salmonellachromosoms können bei Transduktion durch P22 gekoppelt übertragen werden. Es han-

delt sich dann um eine Cotransduktion. Die Transduktion selbst wird wie unter 2.8. beschrieben durchgeführt. Nach Wachstum der Kolonien auf Minimalplatten, die für den einen Marker selektiv sind, werden die Kolonien auf Minimalplatten überstempelt, die auch für den anderen Marker selektiv sind, und wieder bei 37°C bis zum Wachstum der Stempelabdrücke inkubiert. Die Anzahl der Kolonien auf der Mutterplatte setzt man = 100 und berechnet nach der Anzahl der Kolonien auf der Tochterplatte die Cotransduktionshäufigkeit in Prozenten.

Soll durch Cotransduktion das Gen für Restriktion kartiert werden, wird zuerst auf eine dem Gen für Restriktion benachbarte Auxotrophie, im vorliegenden Fall auf den Marker pyrB, selektiert, danach werden die Transduktantenkolonien auf ihre Restriktionsfähigkeit überprüft (vgl. 2.22.).

## 2.12. F-Duktion

Zwischen zwei Bakterienzellen kann genetische Information auf parasexuelle Weise auch über ein F-Epison als Vektor übertragen werden (Lederberg und Tatum, 1946). Um die Übertragung genetischen Materials messen zu können, muß der Empfänger, eine F<sup>-</sup>-Zelle, wie bei der Transduktion, entweder eine Auxotrophie aufweisen oder z.B. unfähig sein zum Laktoseabbau. Auf Laktosemedium können F-Duktanten dann an ihrer Fähigkeit, Kolonien zu bilden, erkannt werden.

Für die Durchführung der F-Duktion werden in Pen-Medium gewachsene log-Kulturen des Spenders und des Empfängers im Verhältnis 1:1 gemischt und unter Bildung einer möglichst großen Oberfläche, also z.B. in liegenden Flaschen, ca. 15 Std. inkubiert. Das F-Duktionsgemisch wird dann auf Minimal-

platten, deren einzige Kohlenstoffquelle Laktose ist, unverdünnt oder in geeigneter Verdünnung plattiert. F-Duktanten, die das Gen für Laktoseabbau erhalten haben, sind fähig, Kolonien zu bilden. Um auf den Empfänger zu selektieren, muß der Spender abgetötet werden. Bei einer F-Duktion zwischen E.coli und S.typhimurium geschieht das durch Vorplattieren der Laktoseplatten mit dem Phagen T1,  $moi = 100$ . Da S.typhimurium gegen T1 resistent ist, überlebt der Empfänger, die E.coli-Spenderzellen werden dagegen quantitativ abgetötet. Wird das F-Episom zwischen zwei S.typhimurium-Zellen F-duziert, wählt man einen streptomycinresistenten Empfänger und versetzt das Laktoseminimalmedium mit  $100 \mu g$  Streptomycin/ml, so daß der streptomycinsensitive Spender abgetötet wird. Nach zweitägiger Inkubation kann man die durch F-Duktanten gebildeten Kolonien auszählen und die F-Duktionshäufigkeit bestimmen. Dazu wird die Anzahl der F-Duktanten durch den Titer des Spenders vor dem Mischen der F-Duktionspartner dividiert.

## 2.13. Herstellen von streptomycinresistenten Zellen

Je 5 ml ÜK der Bakterienstämme LT-2 und LD10 werden durch Zentrifugieren und Resuspendieren in NB auf  $1/10$  ihres Volumens eingengt und quantitativ auf NB-Platten plattiert, die Streptomycin in einer Konzentration von  $600 \mu g/ml$  enthalten. Kolonien, die auf diesen Platten gewachsen sind, gehen auf eine spontan zu Streptomycinresistenz mutierte Zelle zurück. Sie werden abgeimpft, durch mehrfachen Ausstrich gereinigt, danach nochmals durch Plattieren auf streptomycinhaltige Platten auf ihre Resistenz überprüft.

#### 2.14. Herstellen von $^{14}\text{C}$ -markierter P22-Phagen-DNS

Um Phagen-DNS radioaktiv zu markieren, wird der thymidinbedürftige Stamm T4/2 als Wirt benützt. Man beimpft TCG-Medium, das mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Thymidin supplementiert wurde, mit 1/100 des Stammes T4/2 und läßt zur UK wachsen. Der an das Medium adaptierte Stamm wird nun in 1/1000-Verdünnung im gleichen Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine Zelldichte von ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/ml erreicht ist. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 5000 Upm wird das Pellet in gleichem Volumen folgenden Mediums aufgenommen: TCG-Medium + 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Thymidin (spez. Aktivität: 50 mCi/mmol, entspricht 4,8  $\mu\text{g}$  Thymidin/1  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Thymidin) + 1  $\mu\text{g/ml}$  "kaltes" Thymidin + 250  $\mu\text{g/ml}$  Desoxyadenosin. Gleichzeitig wird die Bakteriensuspension mit H5-Phagen,  $\text{moi} = 10$ , infiziert. Während der nun folgenden Phagenvermehrung bauen die Phagen  $^{14}\text{C}$ -Thymidin in ihre DNS ein. Nach Klärung der Kultur durch Lyse der Bakterien, spätestens jedoch nach 90 Minuten, wird verfahren wie bei Lysaten üblich (vgl. 2.2.). Nach Titerbestimmung (vgl. 2.4.) werden die Phagen im  $\text{CsCl}$ -Stufengradienten gereinigt (vgl. 2.3.) und gegen 1/10 SSC-Lösung (vgl. Material 1.3.11.) dialysiert.

#### 2.15. Herstellung von $^3\text{H}$ -markierter A1a- und KB-Phagen-DNS

Man verfährt auf dieselbe Weise, wie unter 2.14. beschrieben, jedoch wird im Markierungsmedium das  $^{14}\text{C}$ -Thymidin durch 10  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Thymidin ersetzt (spez. Aktivität: 5000 mCi/mmol, entspricht 0,48  $\mu\text{g}$  Thymidin/10  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin) und die Kultur entweder mit dem Phagen A1a oder KB jeweils mit einer  $\text{moi} = 10$  infiziert.

## 2.16. DNS-Extraktion mit Sarkosyl

Um eine Größenbestimmung von DNS im Sucrosegradienten durchführen zu können, muß aus dem radioaktiv markierten Phagenlysats die DNS extrahiert werden. Dazu wird das Lysat mit einer Endkonzentration von 1 bis 2% Sarkosyl NL 30 20 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Sarkosyl denaturiert Proteine des Phagen, wodurch der Phagenkopf aufgelöst und die Phagen-DNS freigelegt wird.

## 2.17. Infektion von Bakterien mit $^3\text{H}$ -markierten A1a-Phagen und Reextrahierung der markierten DNS

Eine logarithmisch wachsende Kultur, im vorliegenden Fall der Stämme T4/2 bzw. LD1.1, wird mit dem radioaktiv markierten Phagenlysats mit einer  $\text{moi} = 10$  infiziert. Gleichzeitig wird dem Medium KCN in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-5}$  M beigegeben und das Gemisch 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Phagen adsorbieren zwar an die Zelle und injizieren ihre DNS, innerhalb der Zelle jedoch unterbleibt durch die Wirkung des KCN jede Phagensynthese. Durch zweimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in KCN-freiem Medium werden sowohl das KCN aus dem Medium entfernt als auch nichtadsorbierte Phagen ausgewaschen. Danach wird das Gemisch 12 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Dussoix und Arber (1962) hat bereits nach 8 bis 10 Minuten die restriktive Wirkung voll eingesetzt. Nach ca. 12 Minuten sollte somit alle unmodifizierte DNS degradiert sein. Zu diesem Zeitpunkt wird der Vorgang mit der von Botstein (1968) beschriebenen Lysismischung (vgl. Material 1.3.12.) gestoppt und die Bakterienkultur lysiert. Dazu werden gleiche Volumina des Lysats und der Lysismischung vermennt und 10 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur weiteren DNS-Extrahierung wird eine Sarkosylbehandlung, wie unter 2.16. be-

schrieben, angeschlossen. Zur Entfernung der Proteine aus der DNS-Lösung wird die DNS einer im folgenden beschriebenen Phenolextraktion unterzogen.

## 2.18. Phenolextraktion von DNS

Die Extraktion von DNS aus der mit Sarkosyl vorbehandelten Lösung geschieht mit puffergesättigtem Phenol. Dieses wird folgendermaßen hergestellt: Man schmilzt das Phenol bei 45°C und gibt unter Schütteln soviel 0,1M Tris-Puffer, pH 7,4 dazu, bis eine Sättigung an einer Aufhellung der Lösung erkennbar wird. Dann zentrifugiert man das Gemisch 15 Minuten bei 20°C und 5000 Upm. Die untere Phase im Zentrifugengläschen ist das puffergesättigte Phenol.

Gleiche Volumina DNS-Lösung und puffergesättigtes Phenol werden nun 20 Minuten vorsichtig gerollt. Anschließend wird 15 Minuten bei 5000 Upm und 20°C zentrifugiert, wodurch eine Phasentrennung eintritt. Die obere Phase enthält die gereinigte DNS. Um mechanisches Zerstören durch Scherkräfte zu vermeiden, wird die DNS mit einer weitlumigen Pipette vorsichtig abpipettiert und gegen eine Dialysemischung aus gleichen Teilen 0,01M Tris-Puffer, pH 7,4 (vgl. Material 1.3.9.) und 0,01M EDTA-Lösung zwei Tage bei 2 - 3-maligem Erneuern der Dialyse-Flüssigkeit dialysiert.

## 2.19. Zentrifugation von DNS im neutralen 5-20%igen Sucrose-Gradienten

In die eine Mischkammer eines Gradientenmischers werden 2,2 ml einer 5%igen Sucroslösung (vgl. Material 1.3.13.), in die andere Kammer 2,1 ml einer 20%igen Sucroslösung gefüllt. In Cellulosenitratröhrchen werden nun auf ein 0,5 ml starkes CsCl-Kissen lineare 5-20%ige Gradienten ge-

fällt. Über den Gradienten schichtet man 0,1 ml der  $^{14}\text{C}$ -markierten DNS des Phagen H5 als Referenz (vgl. 2.14.) und 0,1 ml derjenigen  $^3\text{H}$ -markierten Phagen-DNS (vgl. 2.15.), deren Größe untersucht werden soll. Man zentrifugiert 3 Stunden bei 35 000 Upm (= 150 000 x g am Röhrchenboden) und  $23^\circ\text{C}$  im SW 50.1 Rotor in der Beckmann-Ultrazentrifuge L 2. Je weiter Moleküle in die Richtung des Röhrchenbodens gewandert sind, desto größer ist ihr Molekulargewicht.

## 2.20. Auswertung der Gradienten

Nach dem Zentrifugieren werden die Röhrchen am Boden mit einer Kanüle angestochen. Man fängt den Gradienten in Fraktionen zu je 10 Tropfen auf Glasfaserfilter auf. Die Filter werden ca. 1 Std. bei  $60^\circ\text{C}$  getrocknet und ca. 1 Std. mit 10%iger TCA behandelt, wodurch die DNS gefällt wird. Die TCA und gefällte Nucleotide werden durch ca. 30-minütiges Waschen mit Aceton entfernt und anschließend die Filter bei  $60^\circ\text{C}$  getrocknet. Nach Einlegen der Filter in mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (vgl. Material 1.3.14.) gefüllte Gläschen wird die Radioaktivität im Mark II-Scintillationszähler von Nuclear Chicago gemessen.

## 2.21. Bestimmung des Molekulargewichts der zentrifugierten DNS

Nach Auswertung der Gradienten im Scintillationszähler wird die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten zeichnerisch dargestellt. Dabei stellt die Anzahl der counts pro Minute die Ordinate dar und die Nummer der Fraktionen die Abszisse. Die Sedimentationsstrecke der  $^{14}\text{C}$ -markierten P22-Referenz-DNS, gemessen vom Meniskus des Gradienten bis zum Maximum der Radioaktivität wird verglichen mit derjenigen der  $^3\text{H}$ -markierten A1a-, bzw. KB-DNS. Mit folgender Beziehung läßt

sich dann das Molekulargewicht der unbekannten DNS ermitteln:

$$\frac{D_2}{D_1} = \left[ \frac{M_2}{M_1} \right]^{0,35}$$

Dabei sind  $M_1$  und  $M_2$  die jeweiligen Molekulargewichte und  $D_1$  und  $D_2$  die entsprechenden Sedimentationsstrecken, ausgedrückt in Fraktionen.

## 2.22. Strichtest zur Identifizierung von Restriktionsmutanten

Colson et al. (1969) beschrieben einen Schnelltest zur Auf-  
findung von bakteriellen Restriktionsmutanten. Das gleiche  
Prinzip wird im vorliegenden Fall angewandt. NB-Platten  
werden halbseitig vorplattiert mit jeweils  $10^5$  KB:LD10, al-  
so unmodifizierten Phagen, und  $10^5$  KB:LT-2, also modifi-  
zierten Phagen. Mit der Verwendung des Phagen KB umgeht man  
die Immunitätsbarriere, die durch die Lysogenität der zu  
testenden Bakterienstämme gegeben ist, da die Phagen KB  
und P22 heteroimmun sind. Die zu testenden Bakterienkolo-  
nien werden nach Reinigung durch Einzelkolonienausstrich  
in 1 ml M9-Puffer suspendiert. Jede Kolonie wird nun von  
der mit unmodifizierten Phagen vorplattierten Plattenhälft-  
e in die mit modifizierten Phagen vorplattierte Hälfte zu  
einem dünnen Strich ausgezogen. Auf diese Weise lassen sich  
pro Platte ca. 8 bis 10 Kolonien testen. Nach Inkubation  
bei  $37^\circ\text{C}$  wachsen Restriktionsmutanten auf keiner Platten-  
hälfte, während Restriktions-Wildtyp-Stämme nur durch KB:  
LT-2 lysiert werden. Der über die mit KB:LD10 vorplattier-  
te Hälfte verlaufende Strich zeigt bakterielles Wachstum.

## 2.23. Mutagenisieren von Bakterien

Für die Suche nach einem neuen Restriktions-Modifikations-System wurde der WT-Stamm LT-2 mutagenisiert. Aus einer frischen UK wird NB mit 1/100 angeimpft. Man läßt die Kultur bis zu einem Titer von ca.  $5 \times 10^7$  Zellen wachsen, setzt dann in einer Endkonzentration von  $7 \mu\text{g/ml}$  das Mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, sog. NG, zu und schüttelt die Kultur ca. 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ . Durch mehrmaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in NB wird das NG ausgewaschen. Zur Segregation der Mutanten läßt man dann die Kultur noch einmal für die Dauer einer Generationszeit, also ca. 30 Minuten, bei  $37^\circ\text{C}$  gerollt oder geschüttelt wachsen. Einen Anhaltspunkt für die Effizienz der Mutagenese erhält man durch die Bestimmung des Anteils von induzierten Auxotrophen in der mutagenisierten Kultur. Dazu plattiert man eine geeignete Verdünnung der mutagenisierten Kultur auf NB-Platten und überstempelt auf M9-Platten. Die Anzahl der Kolonien auf der NB-Platte wird = 100 gesetzt, und aus der Differenz der Kolonien auf der Mutter- und Tochterplatte der Anteil an auxotrophen Zellen in Prozenten errechnet.

## 2.24. Sprühmethode zum Auffinden von LD-Mutanten

Die mutagenisierte Bakterienkultur wird in einer solchen Verdünnung auf M9-Platten plattiert, daß ca. 100 Kolonien/Platte wachsen. Die Kolonien werden auf M9-Platten überstempelt, auf die ca.  $10^7$  H5-Phagen vorplattiert waren. Die überstempelten Kolonien wirken als Spender. Nach 5 bis 6 Stunden Inkubation, während der sich um jede Kolonie ein Lysat bilden konnte, wird der Spender mit Chloroformdampf abgetötet. Nach gründlichem Lüften der Platten werden die Empfängerstämme SA4(P22) oder SA1145(P22) gleichmäßig über

die Platten gesprüht. Um eine genügend hohe Dichte des Empfängers auf der Platte zu gewährleisten, wurde dieser durch Zentrifugieren und Resuspendieren in Saline + 20% NB auf 1/20 des Volumens eingeeengt. Nach 2 Tagen Inkubation der Sprühplatten bei 37°C wachsen Transduktantenkolonien im Bereich der Spenderkolonienabdrücke. Durch Vergleich der Koloniedichte können potentielle LD-Mutanten angesprochen und durch Vergleich der Mutterplatte mit der Stempelplatte die Ausgangskolonie abgeimpft und über Transduktion auf ihre LD-Eigenschaft überprüft werden.

## 2.25. Mutagenisieren von Phagen

Um Phagenmutanten zu induzieren, wird aus einer frischen UK des Stammes LT-2 angeimpft und zur log-Kultur gezogen, wie unter 2.2. beschrieben wurde. Gleichzeitig mit der Infektion des zu mutagenisierenden Phagen, in diesem Fall des Phagen H5, wird der Bakterienkultur das Mutagen NG (vgl. 2.23.) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Die Kultur wird bei 37°C bis zur Klärung der Kultur, längstens jedoch noch 2 Std., weitergeschüttelt. Während der in dieser Zeit ablaufenden Phagenvermehrung erfolgt die Mutagenese. Das Lysat wird zu Ende aufbereitet, wie unter 2.2. beschrieben. Durch das Auftreten von Plaquemorphologiemutanten läßt sich der Erfolg der Mutagenese grob abschätzen.

## 2.26. Isolieren von P22-Mutanten, die gegen LD-spezifische Restriktion sensitiv sind

Die mutagenisierten Phagen werden in geeigneter Verdünnung auf einen Bakterienstamm plattiert, der nicht in der Lage ist, die Phagen zu modifizieren, also z.B. auf dem Stamm LD10. Man sticht die einzelnen Plaques mit Pasteur-Pipetten aus, überführt das Agarblöckchen in 1 ml NB und tötet

mitgeschleppte Bakterien durch viertelstündige Inkubation der Suspension mit einigen Tropfen Chloroform bei 37°C ab. Die aus dem Agarblock in das NB diffundierenden Phagen werden schrittweise verdünnt und aus den geeigneten Verdünnungen eop-Bestimmungen (vgl. 2.5.) auf den Indikatoren LD10 und LT-2 durchgeführt. Plaques, die einen Restriktionseffekt von mindestens  $10^{-1}$  zeigen, werden weiter untersucht, bzw. auf gleiche Weise, wie in 2.25. beschrieben, weitermutagenisiert.

## 2.27. Mischinfektion mit P22 und den Phagen A1a, A3 oder L

Um die aus einer Mischinfektion hervorgehenden Phagen voneinander unterscheiden zu können, werden Stämme mit unterschiedlicher Plaquemorphologie verwendet. Die Plaques der Phagen A1a, A3 und L sind trüb, der Phage P22 wird dagegen als Klarplaquemutante H5 eingesetzt.

### 2.27.1. Mischinfektion mit P22 und dem Phagen A1a

Eine logarithmisch wachsende Kultur des Stammes LD10 wird zuerst mit dem Phagen H5,  $moi = 10$ , infiziert und nach 20 Minuten erfolgt die Nachinfektion des Phagen A1a,  $moi = 1$ . Das Mischlysat wird weitere 40 Minuten geschüttelt und wie in Methode 2.2. weiterbehandelt. Anschließend wird eine eop-Wert-Bestimmung (vgl. Meth. 2.5.) des Phagen A1a durch Auszählen der trüben Plaques durchgeführt.

### 2.27.2. Mischinfektion mit P22 und den Phagen A3 bzw. L

Eine logarithmisch wachsende Kultur des Stammes LD10, bzw. LT-2 wird jeweils mit folgenden Einzelphagen, bzw. Phagen gemischen infiziert: A3:LD10, A3:LD10 + H5:LD10, L:LD10 oder L:LD10 + H5:LD10. Bei den Mischinfektionen betrug die  $moi$  der einzelnen Phagen  $moi = 2$ , so daß die Gesamt- $moi$  4

beträgt. Auch die Einzelinfektionen wurden mit einer  $moi = 2$  durchgeführt. Um einen Einblick in die Kinetik einer eventuellen Modifikation oder andersartigen Schutzfunktion des P22 zu erhalten, werden alle genannten Einzelphagen und Phagengemische gleichzeitig mit exponentiell wachsenden Empfängerkulturen gemischt und mit  $10^{-3}$  molarem KCN synchronisiert (vgl. 2.17.). Nach 10-minütiger Inkubation, Zentrifugation und Resuspendierung aller infizierten Kulturen, setzt die Phagenvermehrung überall gleichzeitig ein. Nach 20, 30 und 50 Minuten weiteren Schüttelns werden den Lysaten Proben entnommen, diese, wie in Meth. 2.2. beschrieben, weiterverarbeitet und in geeigneter Verdünnung auf den Stämmen LT-2 und LD10 zum Zweck einer eop-Bestimmung (vgl. 2.5.) plattiert.

#### 2.28. Kreuzung des Phagen L mit verschiedenen amber-Mutanten des Phagen P22

Um DNS-Bereiche des Phagen L abzutasten, die für die vorliegende Restriktion sensitiv sind, wurden Kreuzungen zwischen dem Phagen L und den in Mat. 1.2.1. aufgeführten amber-Mutanten des P22 durchgeführt und die Rekombinanten auf ihren Grad der Restriktion untersucht. Die zu kreuzenden Phagen werden dazu auf Platten, die mit dem Stamm Su70 (vgl. Mat. 1.1.1.) in Weichagar vorplattiert waren, übereinander aufgetropft. Die Titer beider Phagen sind gleich und hoch genug (ca.  $10^9$ /ml), um möglichst viele Zellen mit beiden Phagen zu infizieren. Nach Bebrüten der Platten bei  $37^\circ\text{C}$  sind die Zellen im Tropfareal lysiert. Aus dem Lysisbereich wird mit einer Pasteurpipette ein Agarblock ausgestochen, dieser in 1 ml NB überführt und mit einigen Tropfen Chloroform ca. 15 Min. inkubiert, um mitgeschleppte Bakterien abzutöten. Anschließend werden die Phagen in geeigneter Verdünnung auf dem Stamm Su70 plattiert, so daß Einzelplaques erhalten werden. Diese Plaques impft man mit Zahnstochern

ab und überträgt die anheftenden Phagen durch Einstechen in den Agar auf 4 Platten, die jeweils mit den Stämmen Su70(L), Su70(sie1), LT-2 und Su70 vorplattiert worden waren (vgl. Mat. 1.1.1.). Phagen, die auf allen vier Platten um die Einstichstelle Lyse zeigen, sind Rekombinanten der gesuchten Art. Sie werden aus der mit Su70 vorplattierten Platte wie beschrieben mit einer Pasteurpipette ausgestochen und weiterbehandelt. Nach einer weiteren Kontrolle der isolierten Phagen, ob sie auf den Stämmen Su(L), Su(sie1) und LT-2 wachsen, plattiert man sie auf dem Stamm LD10 zu Einzelplaques. Diese sticht man wieder wie beschrieben aus und untersucht sie auf ihren Restriktionsfaktor. Dazu werden für die durch das Wachstum auf dem Stamm LD10 an den für dieses System spezifischen Basensequenzen unmodifizierten Phagen die jeweiligen eop-Werte (vgl. 2.5.) durch Plattieren auf den Stämmen LD10 und LT-2 bestimmt.

## C.     ERGEBNISSE

### 1.     Nachweis und Beschreibung eines RM-Systems

#### 1.1.   Transduktion mit alysogenem Empfänger

Da die Experimente von v. Lieres (1974) gezeigt haben, daß der sogenannte LD-Effekt, d.h. eine um ca. den Faktor 40 verringerte Transduktionshäufigkeit bei Verwendung eines LD-Stammes als Spender, nicht auf eine um diesen Faktor verringerte Produktion dieser t.p. zurückzuführen ist, bleibt die Hypothese zu untersuchen, inwiefern ein restriktiver Mechanismus in der Empfängerzelle für die Verminderung rekombinativer Transduktanten verantwortlich ist. Zwei verschiedene Systeme können im vorliegenden Fall ursächlich sein: Einmal die zuerst von Arber und Dussoix (1962) ausführlich beschriebene Restriktion unmodifizierter DNS durch bakterielle Enzyme, zum anderen ein phageneigenes, restriktives System. Dabei kann wieder unterschieden werden zwischen phagenverursachter Restriktion im eben genannten Sinn, wie es zum Beispiel für den Phagen P1 (Arber und Dussoix, 1962) beobachtet worden ist, und allgemein superinfizierende DNS betreffende Ausschlußsysteme des Phagen (Susskind et al., 1971). Da allgemein für Transduktionen aus technischen Gründen lyso-gene Empfänger verwendet werden (vgl. Meth. 2.8.), wäre es denkbar, daß entweder phageneigene Restriktion oder phageneigene Superinfektionsausschlußsysteme des Prophagen einen restriktiven Einfluß ausüben. Für den Superinfektionsausschluß sind die Phagengene sieA und sieB verantwortlich (Susskind et al., 1971; Ebel-Tsipis und Botstein, 1971). Während durch das Produkt des Gens sieA sowohl heteroimmune als auch homo-immune Phagen-DNS durch einen vermutlich an der Zellmembran wirkenden Abbau bis zu Oligonucleotiden zerstört wird, schließt das Gen sieB nur heteroimmune Phagen-DNS aus. Da diese Aus-

schlußsysteme des Phagen transduzierende Partikel je nach übertragenem Marker bis zum Faktor 80 ausschließen sollen (Ebel-Tsipis und Botstein, 1971), wurde überprüft, ob die t.p. eines auf einem LD-Stamm gezogenen Lysates stärker sensitiv sind für die phageneigenen sie-Systeme. In der Arbeit von v. Lieres (1974) wurden Experimente zu diesem Problem gemacht, in denen der Empfänger einmal mit einem Phagen lysogenisiert wurde, dessen sie-Gene defekt waren, zum anderen gar keinen Prophagen mehr enthielten. Im letzten Fall wurde die Transduktion mit dem Wildtyp-Trübplaquephagen H1 durchgeführt, nicht, wie üblich, mit der Klarplaque-mutante H5 (vgl. Meth. 2.8.), um die Gefahr einer nachträglichen Lyse der nichtlysogenen rekombinativen Transduktanten auf der Platte zu verringern. In keinem der beiden Fälle konnte ein dezimierender Einfluß des Prophagen beobachtet werden.

Zur eindeutigen Klärung der Frage, ob die beobachtete Restriktion durch den Phagen verursacht wird, schien es wünschenswert, die Transduktion mit alysogenem Empfänger zu wiederholen. Bei einer Transduktion mit dem Phagen H1 sind die Versuchsbedingungen nicht eindeutig und daher die Ergebnisse nicht exakt reproduzierbar, da der Wildtypphage, anders als der Klarplaquephage, neben dem lytischen Zyklus auch den Weg der Lysogenie gehen kann. Verwendet man aus diesem Grund einen Klarplaquephagen bei gleichzeitig alysogenem Empfänger, müssen die Versuchsbedingungen geändert werden, damit man brauchbare Ergebnisse erhält. Für die Durchführung des Versuchs (vgl. Meth. 2.10.) mit alysogenem Empfänger und einem Klarplaquephagen als Vektor wurde mit einer  $moi < 1$  beimpft. Das reduziert die Gefahr der Lyse durch Mehrfachinfektion während der Transduktionszeit. Eine zweite Maßnahme in dieser Richtung war die Verkürzung der

Adsorptionszeit auf 5 Minuten. Um eine nachträgliche Lyse der gebildeten rekombinativen Transduktanten auf der Platte zu verhindern, wurde die Bebrütungstemperatur auf 42°C heraufgesetzt. Bei dieser Temperatur ist der self-assembly-Schritt des Zusammenfügens von Kopf- und Schwanzteil gestört (Israel, 1967). Da unter den genannten Bedingungen das Transduktionsereignis selbst verhältnismäßig selten wird, bot es sich für diesen Versuch an, eine Mutante des P22, den Stamm HT13/4, zu verwenden. Es handelt sich hierbei um eine Mutante des Klarplaquephagen H5 mit erhöhter Transduktionshäufigkeit (Schmieger, 1971b). In Vorversuchen wurde überprüft und festgestellt, daß sich der Stamm HT in Transduktionen mit einem LD-Stamm ebenso verhält wie der sonst verwendete H5, d.h. bei Einsatz eines HT-Phagen als Vektor wird die Zahl der t.p. im Empfänger um den gleichen Faktor reduziert.

Wegen des angenehmen Aspekts der höheren Ausbeute an Transduktanten wurde dieser Stamm auch in anderen Versuchen dieser Arbeit verwendet.

Das Ergebnis des geschilderten Experiments ist der Tabelle 1.1. (S. 43) zu entnehmen. Sie zeigt, daß der bei Standardtransduktionen in der Empfängerzelle integrierte Prophage mit seinen sie-Funktionen oder möglicherweise vorhandenen Genen für Restriktionsenzyme nicht für die bei LD-Spender-Transduktionen beobachtete Verringerung der rekombinativen Transduktanten verantwortlich ist. Auch ohne die Anwesenheit des Prophagen ist die Transduktionshäufigkeit, wenn das Lysat von einem LD-Stamm kommt, um den Faktor 60 reduziert. Die Tatsache, daß nicht der für eine Transduktion des Markers His mit dem Phagen HT13/4 übliche Wildtyp T/P-Wert von ca.  $3 \times 10^{-5}$  erreicht wird, dürfte mit den veränderten Versuchsbedingungen zusammenhängen.

Tabelle 1.1.

| Phage       | Empfänger<br>His   |
|-------------|--------------------|
| HT13/4:LT-2 | $6 \times 10^{-6}$ |
| HT13/4:LD10 | $1 \times 10^{-7}$ |

T/P-Werte von Transduktionen mit sensitivem Empfänger.  
Versuchsbedingungen:  $moi = 0,05$ ; Wasserbad =  $37^{\circ}\text{C}$ ;  
Brutschrank =  $42^{\circ}\text{C}$ ; Dauer der Adsorptionszeit = 5 Min.  
Sofort auf  $42^{\circ}\text{C}$  vorgewärmte Glasplatten plattiert.  
2 Tage bei  $42^{\circ}\text{C}$  bebrütet.

#### 1.2. Transduktion zwischen LD-Spender und LD-Empfänger

Wenn die Hypothese stimmt, daß eine LD-Mutante in den Genen für Restriktion und Modifikation defekt ist, sollte bei einer Transduktion zwischen einem LD-Spender und einem LD-Empfänger die beobachtete Verminderung des T/P-Wertes nicht mehr auftreten. Zwar werden die transduzierenden Partikel im Spender nicht modifiziert, sie sollten jedoch im Empfänger wegen der postulierten Restriktionsdefizienz auch nicht mehr abgebaut werden können. Zuerst wurde folgende Transduktion zwischen einem LD-Spender und einem LD-Empfänger durchgeführt:

Beim Spender handelte es sich um den Stamm LD10, der Empfänger war durch Mutagenisieren des LD10 auxotroph für die Aminosäure Histidin geworden. In der Vergleichstransduktion war der Wildtyp-Stamm LT-2 der Spender und der Stamm HisB22 Empfänger. Das Ergebnis dieser Transduktion ist in Tabelle

1.2. (S. 47) gezeigt. Der Wert der ersten Zeile in der ersten Spalte stellt den Wildtypwert dar. Der Wert der zweiten Zeile in der zweiten Spalte sollte diesem T/F-Verhältnis gleichkommen. Diese Voraussage ließ sich nicht ganz bestätigen. Verglichen mit dem typischen LD-T/F-Wert von  $3 \times 10^{-8}$  (zweite Zeile, erste Spalte) zeigt der für die LD-LD-Transduktion erhaltene T/P-Wert von  $4 \times 10^{-7}$  jedoch bereits eine signifikant höhere Zahl an Transduktanten. Es gibt folgende Erklärungsmöglichkeit für die Tatsache, daß der Wildtypwert nicht erreicht wird: Der Marker his des Stammes LD10 ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht identisch mit dem Marker HisB22, bei dem es sich um eine Deletion handelt. Es ist bekannt, daß unterschiedliche Marker auch mit unterschiedlicher Häufigkeit transduziert werden. Daß der Kontroll-T/P-Wert für den Marker HisB22 nicht erreicht wird, ist somit vermutlich darauf zurückzuführen, daß der Marker his des Stammes LD10 mit einer anderen Häufigkeit transduziert wird, als der Marker HisB22, der zu den am besten transduzierbaren Markern zählt. Immerhin liefern die Transduktionen aus WT-Spender und LD-Spender in einen LD-Empfänger schon Werte, die auf eine fehlende Restriktionsaktivität der LD-Stämme hindeuten. Um die Ungenauigkeit des Vergleichs mit Wildtyp-T/P-Werten zu umgehen, die durch die markerabhängige, unterschiedliche Transduktionshäufigkeit entsteht, kann die Transduktion eines Markers durchgeführt werden, der mit demjenigen der Kontrolltransduktion isogen ist. Es werden also bei beiden Transduktionen identische Marker übertragen. Folgende Transduktionen wurden durchgeführt:

Spender war wieder der Stamm LD10, der keinerlei Auxotrophie trägt; als Empfänger diente der Stamm LD1.1, der durch Mutation aus dem Stamm T4/2 entstand (v. Lieres, 1974) und somit den gleichen Mutationsort bezüglich des Defekts in der

Thymidinsynthese trug. Für die Kontrolltransduktion wurde als Spender der Wildtyp-Stamm LT-2 verwendet und als Empfänger der Stamm T4/2. Da hier die Übertragung isogener Marker beobachtet wird, kann für die LD-LD-Transduktion ein reiner WT-Wert erwartet werden. Wie die dritte und vierte Spalte der Tabelle 1.2. (S. 47) zeigen, kommt der erhaltene Wert von  $8 \times 10^{-6}$  dem WT-Wert von  $1,3 \times 10^{-5}$  nahezu gleich. Die Verschiebung der absoluten T/P-Werte in diesem und dem nachfolgend beschriebenen Experiment hängt mit der Verwendung des Phagen HT13/4 zusammen. Zwar waren nun bei dieser Transduktion identische Auxotrophiemarker miteinander verglichen worden, es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Mutationen in den im Experiment eingesetzten Stämmen LD10 und LD1.1 nicht in identischen Genen liegen. Diese Schlußfolgerung wurde aus Experimenten von v. Lieres (1974) gezogen, die zeigten, daß der Phage P22 mit einer um den Faktor 10 schwankenden Effizienz auf LT-2 wächst, je nachdem auf welchem LD-Stamm er vorher gezogen worden war. Es ließen sich zwei Gruppen erkennen, und zwar mit einer  $eop < 1$  und  $> 1$ .

Zwar gehören die Stämme LD10 und LD1.1 beide in die Gruppe mit einer  $eop < 1$ , um jedoch jede Unsicherheit auszuschließen, wurden Ausgangsbedingungen für das Experiment geschaffen, bei denen sowohl der Auxotrophiemarker, als auch der LD-Marker identisch waren. Dazu wurde der Stamm LD1.1 (vgl. Mat. 1.1.1.), der ein Abkömmling des Stammes T4/2 und somit thymidinbedürftig war, durch Transduktion zu einem  $thy^+$ -Stamm revertiert, so daß er für eine Transduktion des Markers  $thy$  wieder als Spender einzusetzen war.

Als Spender fungierte somit im vorliegenden Experiment der Stamm LD1.1  $thy^+$ , als Empfänger der Stamm LD1.1  $thy^-$ . Bei der Kontrolltransduktion ist der Spender der WT-Stamm LT-2 und der Empfänger der Stamm T4/2. Zu vergleichen sind somit

Transduktionen mit isogenen Markern, sowohl bezüglich der Auxotrophie, als auch des LD-Gens. Wie aus Tabelle 1.2., fünfte und sechste Spalte ersichtlich ist, wird auch in diesem Experiment der postulierte Wildtyp-Wert erreicht. Der für die Transduktion  $LD1.1 \text{ thy}^+ \longrightarrow LD1.1 \text{ thy}^-$  erhaltene T/P-Wert von  $1,1 \times 10^{-5}$  entspricht dem T/P-Wert der Transduktion  $LT-2 \longrightarrow T4/2$  von  $1,7 \times 10^{-5}$ .

Die Hypothese, es handle sich bei den untersuchten Transduktionsspendermutanten um solche, die nicht mehr in der Lage sind, ihre eigene DNS zu modifizieren, und daher in einem Empfänger mit funktionierendem Restriktionssystem um den ca. 40-fachen Wert dezimiert werden, wird durch die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente erhärtet.

Tabelle 1.2.

| Phage                        | E m p f ä n g e r    |                      |                      |                      |                      |                      |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                              | 1. Experiment        |                      | 2. Experiment        |                      | 3. Experiment        |                      |
|                              | 1                    | 2                    | 3                    | 4                    | 5                    | 6                    |
|                              | His(P22)             | LD10his(P22)         | T4/2(P22)            | LD1.1(P22)           | T4/2(P22)            | LD1.1(P22)           |
| H5:LT-2                      | $1,3 \times 10^{-6}$ | $8,0 \times 10^{-7}$ |                      |                      |                      |                      |
| H5:LD10                      | $3,0 \times 10^{-8}$ | $4,0 \times 10^{-7}$ |                      |                      |                      |                      |
| HT13/4:LD10                  | $7,3 \times 10^{-7}$ |                      | $4,3 \times 10^{-7}$ | $8,0 \times 10^{-6}$ |                      |                      |
| HT13/4:LT-2                  | $1,0 \times 10^{-5}$ |                      | $1,3 \times 10^{-5}$ | $8,0 \times 10^{-6}$ | $1,7 \times 10^{-5}$ | $4,8 \times 10^{-6}$ |
| HT13/4:LD1.1thy <sup>+</sup> | $1,7 \times 10^{-6}$ |                      |                      |                      | $7,0 \times 10^{-7}$ | $1,1 \times 10^{-5}$ |

T/P-Werte von Transduktionen zwischen LD-Spendern und LD-Empfängern und Kontrolltransduktionen mit Wildtyp-Stämmen.

### 1.3. Cotransduktion

Die in dieser Arbeit bezüglich des LD-Phänomens untersuchte und durch das vorhergehend beschriebene Experiment erhärtete Hypothese einer restriktiven Wirkung der Empfängerzelle beinhaltet, daß die DNS der beobachteten t.p. durch Schnitte einer Restriktionsendonuclease im Empfänger in Fragmente zerlegt wird. Es soll kurz erläutert werden, wie eine Abschätzung von Fragmentgrößen aufgrund von gemessenen Cotransduktionshäufigkeiten möglich ist.

Die bakterielle DNS, die in t.p. enthalten ist, beträgt etwa 1/100 der Gesamtlänge des Bakterienchromosoms (Starlinger, 1959; Ozeki, 1959; Schmieger, 1968). Diese Länge reicht aus, um mehr als einen bakteriellen Marker zu transduzieren. Der Abstand der beobachteten Marker muß kleiner sein als das im Phagenkopf verpackte Fragment (Ikeda und Tomizawa, 1965b).

Für die gekoppelte Transduktion bestimmter Marker treten charakteristische Häufigkeiten auf, je nachdem wie weit die beobachteten Marker voneinander und jeder für sich vom Ende des Fragments entfernt sind (Margolin, 1962; Smith-Keary und Dawson, 1963).

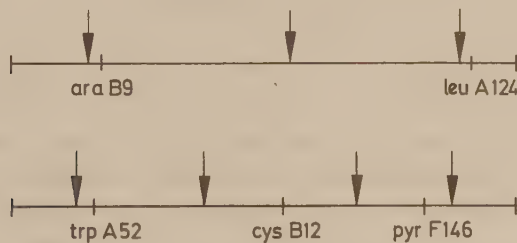
Schmieger und Backhaus (1976) bestimmten mit dem Klarplaquephagen H5 von P22 die Cotransduktionshäufigkeit der Marker leuA124 und araB9 auf einem Fragment, ebenso diejenige der drei Marker trpA52, cysB12 und pyrF146 auf einem anderen Fragment. Wird beispielsweise bei einer Transduktion zuerst auf den Marker leuA124 selektiert und dann auf ein auch für den Marker araB9 selektives Medium gestempelt (vgl. Meth. 2.11.), so beträgt die Cotransduktionshäufigkeit 37 %, d.h. von 100 Empfängern, die den Marker leuA124 durch ein intaktes Gen ersetzt bekommen haben, sind 37 auch wieder in

der Lage, Arabinose zu vergären. Führt man den Versuch in umgekehrter Richtung durch, also selektiert man zuerst auf die Fähigkeit, Arabinose zu vergären und dann auf das Gen für die Leucinsynthese, erhält man eine Cotransduktionshäufigkeit von 44 %. Nach Ozeki (1959) lassen sich aus diesen Ergebnissen Schlüsse auf den Abstand der Marker voneinander und deren Abstand von den Enden des Fragments ziehen.

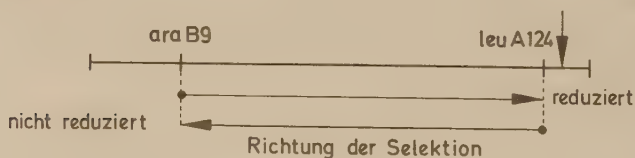
Boyer (1964) und Wood (1966) beobachteten bei F-Duktion und Transduktion, daß bestimmte genetische Marker des E.coli-Chromosoms in Empfängerzellen, deren K- und B-Systeme wirksam sind, getrennt werden.

Es sollte nun durch Cotransduktion getestet werden, ob die Fragmente aus einem LD-Spender-gezogenen Lysat in einem restriktiven Empfänger kürzer erscheinen, als Fragmente, die aus einem Wildtyp-Spender stammen.

Die folgende Zeichnung soll veranschaulichen, welche Schnitte bei einer bestimmten Transduktion für die beiden untersuchten Fragmente leu-ara und trp-cys-pyr beispielsweise denkbar wären.



Liegt der Schnitt zwischen zwei Markern, sollte sich die Cotransduktionshäufigkeit drastisch verringern. Eine geringe Cotransduktionshäufigkeit ist dadurch erklärbar, daß die Bruchstücke getrennt in das Empfängerchromosom einrekombiniert werden, jedoch mit stark verringerter Wahrscheinlichkeit (Dawson, 1963). Liegt der Schnitt an der Peripherie des Fragments, distal der betrachteten Marker, wird die Cotransduktionshäufigkeit für einen Marker um so stärker reduziert sein, je näher der Schnitt am betrachteten Marker liegt. Das gilt auch für einen Marker, der durch einen zentralen Schnitt in die Nähe eines Bruchstückendes gerät. Ist auf einem Fragment nur ein Marker direkt durch einen Schnitt oder durch Schnittnähe beeinträchtigt, sollte in LD-gezogenen Lysaten die Cotransduktionshäufigkeit verschieden sein, je nachdem welcher Marker zuerst selektiert wurde, wie die folgende Abb. illustriert.



Man kann die folgenden vier Ergebnisse erwarten, von denen jedoch für die vorliegende Fragestellung nur die Punkte 1-3 zu diskutieren sind.

- 1) Die Cotransduktionshäufigkeit LD-gezogener Lysate ist, verglichen mit Wildtyp-gezogenen Lysaten, unverändert. Das würde bedeuten, daß die t.p. nicht durch einen Schnitt fragmentiert worden wären.

- 2) Die Cotransduktionshäufigkeit dieser Partikel ist verändert, und zwar reduziert. Dieses Ergebnis spräche für eine Verringerung der Größe der t.p.
- 3) Es kann überhaupt keine Cotransduktion mehr bei t.p. aus LD-Lysaten beobachtet werden. Das kann zweierlei bedeuten: Entweder liegt ein Restriktionsschnitt zwischen den beiden betrachteten Markern und zusätzlich sind diese durch diesen Schnitt so randnah gelegen, daß sie bei der Rekombination eliminiert werden; oder die t.p. werden durch Nucleasen, die keine Restriktionsenzyme, sondern den Phagen-sie-Enzymen ähnlich sind (vgl. 1.1.), in so kleine Bruchstücke zerlegt, daß keine intakten Gene mehr vorhanden sind.
- 4) Die Cotransduktionshäufigkeit ist erhöht.

Für die Durchführung des Versuchs wurden Lysate des Phagen HT13/4 auf dem Wildtyp-Stamm LT-2 und dem LD-Stamm LD10 (vgl. Mat. 1.1.) hergestellt. Die Verwendung des Phagen HT13/4 war auch in diesem Experiment aus statistischen Gründen ratsam, da schon bei einer Wildtyp-Cotransduktion die Anzahl der Transduktantenkolonien auf der Tochterplatte aufgrund der immer unter 100 % bleibenden Cotransduktionshäufigkeit verringert ist, und bei einer LD-Cotransduktion nochmal eine Reduktion dieser Kolonienzahl erwartet wird. Mit diesen Lysaten wurde sowohl der Stamm SA4(P22) mit den Auxotrophien leuA124 und araB9 als auch der Stamm SU687(P22) mit den ebenfalls cotransduzierbaren Markern trpA52, cysB12 und pyrF146 auf übliche Weise transduziert (vgl. Meth. 2.8.). Wie in Meth. 2.11. beschrieben, wurde dann die Cotransduktionshäufigkeit für die genannten Marker bestimmt.

Die Ergebnisse der vergleichenden Cotransduktion sind der Tabelle 1.3. (S. 55) zu entnehmen und zeigen in sämtlichen untersuchten Fällen eine Reduktion der Transduktionshäufigkeit bei t.p. aus Lysaten, die auf dem Stamm LD10 gezogen wurden.

Die Werte der Cotransduktionshäufigkeiten LT-2-gezogener Lysate lassen sich qualitativ mit denen von Schmieger und Backhaus (1976) vergleichen. Zwar kartiert der von diesen Autoren verwendete Phage HT12/4 an derselben Stelle im P22-Genom, wie der hier verwendete Phage HT13/4 (Raj, Raj und Schmieger, 1974). Geht man jedoch von der Hypothese aus, daß die HT-Mutanten bei der Bildung von t.p. nicht auf definierte Schnittstellen angewiesen sind, ist zu erwarten, daß in verschiedenen Lysaten die beobachteten Marker durch unterschiedliche Schnitte auch veränderte Entfernungen zu den Fragmentenden und somit auch veränderte Cotransduktionshäufigkeiten haben. Im vorliegenden Experiment wurden, auch für die einzelnen Versuche, verschiedene Lysate benützt. Chelala und Margolin (1976) beobachteten, daß von drei verschiedenen HT-Mutanten jede unterschiedliche Cotransduktionshäufigkeiten zeigt, was daraufhin deutet, daß sich die durch diese Mutanten gebildeten Fragmente voneinander unterscheiden.

Ganz allgemein ist die Reproduzierbarkeit von Cotransduktionshäufigkeiten problematisch. Sie hängt wesentlich von exakt gleichen und optimalen, den physiologischen Zustand der Zelle beeinflussenden Versuchsbedingungen ab (Margolin, persönliche Mitt.). Da in den vorliegenden Versuchen aus schon erwähnten Gründen das Bestreben Vorrang hatte, möglichst hohe Transduktantenzahlen auf einer Mutterplatte zu erreichen, mag sich die Anhäufung der Kolonien auf den physiologischen Zustand der Zellen negativ ausgewirkt haben,

ein Umstand, der die Schwankung der Cotransduktionshäufigkeit in den einzelnen Ansätzen erklären könnte.

Überraschend an den Ergebnissen dieses Experiments ist, daß weder ein Fall zu beobachten ist, in dem die LD-Cotransduktionshäufigkeit, verglichen mit Wildtyp-Werten, völlig unverändert wäre, noch ein Fall, in dem gar keine Cotransduktion mehr stattfindet. Wie bereits erläutert, kann man, je nachdem ob zwei Marker durch einen Schnitt getrennt wurden, oder ob ein Marker keine Schnittstelle in seiner Nähe hat, beide Fälle erwarten.

Wenn man vom noch zu diskutierenden Ergebnis des Experiments 1 bezüglich der Marker leu und ara absieht, zeigt die Cotransduktionshäufigkeit bezüglich der Marker trp und pyr bei Erstselektion auf den Marker trp die stärkste Reduktion. Bei Erstselektion auf den Marker pyr liegt die Reduktion bei dem allgemein zu beobachtenden Faktor 1,5 bis 3. Das würde bedeuten, daß der Marker pyr stärker von einem distalen Schnitt beeinträchtigt ist als der Marker trp. Die Ergebnisse eines später zu beschreibenden Experiments (vgl. Erg. 1.5. und Tab. 1.5.) bestätigen diese Vermutung. Die relativ starke Reduktion der Cotransduktionshäufigkeit im Experiment 1 bezüglich der Marker ara und leu könnten ein Beispiel dafür sein, daß zwischen den Markern ein Schnitt liegt und die Restriktionsfragmente wegen der geringen Größe mit sehr geringer Häufigkeit, jedoch getrennt voneinander, einrekombiniert werden und so in geringem Maße cotransduziert erscheinen. Da jedoch in den darauffolgenden Experimenten diese starke Reduktion nicht bestätigt werden konnte, scheinen eher durch hohe Kolonienzahlen verursachte ungünstige und schlecht konstant zu haltende Versuchsbedingungen sowohl den Mechanismus der Cotransduktion als auch den der Restriktion einer gewissen

Variation auszusetzen. Arber (1965) erläutert, daß der physiologische Zustand einer Zelle sogar für eine genaue quantitative Messung der eop eine große Rolle spielt und eop-Werte nicht als fixierte Werte anzusehen sind, sondern beachtlichen Variationen unterliegen, es sei denn, die Versuchsbedingungen werden rigoros konstant gehalten. Es sei daher eine qualitative Betrachtung von eop-Werten sinnvoller. Diese Einschränkung kann sicherlich auch bei der Beobachtung von t.p., ganz besonders bei Cotransduktionen, berücksichtigt werden.

Die allgemein zu erkennende Verringerung der Cotransduktionshäufigkeiten bei t.p., die in LD-Spendern entstanden waren, festigt jedoch die Hypothese, daß die DNS dieser t.p. im Spender nicht modifiziert und daher im restriktiven Empfänger degradiert wird.

Tabelle 1.3.

| Selektion |           | Phage                  | Experiment 1             |                          |                                | Faktor | Experiment 2 |              |          |     | Experiment 3 |              |          |     |
|-----------|-----------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------|--------------|--------------|----------|-----|--------------|--------------|----------|-----|
| 1. Marker | 2. Marker |                        | Transduktionen 1. Marker | Transduktionen 2. Marker | Cotransduktionshäufigkeit in % |        | 1            | 2            | 3        | 4   | 1            | 2            | 3        | 4   |
| ara       | leu       | HT:LT-2=A<br>HT:LD10=B | 4988<br>3482             | 2346<br>181              | 47<br>5                        | 4      | 1750<br>4976 | 1102<br>1076 | 62<br>21 | 2,9 |              |              |          |     |
| leu       | ara       | A<br>B                 | 5738<br>9681             | 2169<br>492              | 37<br>5                        | 7,4    | 5863<br>7774 | 3193<br>2312 | 54<br>29 | 1,8 | 2386<br>5758 | 1063<br>1395 | 44<br>24 | 1,8 |
| pyr       | trp       | A<br>B                 | 1525<br>2320             | 328<br>225               | 21<br>9                        | 2,3    | 2654<br>5832 | 487<br>756   | 18<br>12 | 1,5 | 520<br>1302  | 66<br>94     | 12<br>7  | 1,7 |
| trp       | pyr       | A<br>B                 | 5559<br>5229             | 1130<br>314              | 20<br>6                        | 3,3    | 3502<br>3152 | 1186<br>191  | 33<br>6  | 5,5 | 335<br>2636  | 74<br>237    | 22<br>9  | 2,4 |
| pyr       | cys       | A<br>B                 |                          |                          |                                |        | 285<br>816   | 225<br>233   | 78<br>28 |     | 520<br>1302  | 300<br>278   | 57<br>21 | 2,7 |
| cys       | pyr       | A<br>B                 |                          |                          |                                |        | 740<br>1304  | 259<br>166   | 35<br>12 | 2,9 | 396<br>1246  | 204<br>177   | 51<br>14 | 3,6 |
| trp       | cys       | A<br>B                 |                          |                          |                                |        | 3502<br>3152 | 1615<br>584  | 46<br>18 | 2,5 | 335<br>2636  | 160<br>747   | 47<br>28 | 1,6 |
| cys       | trp       | A<br>B                 |                          |                          |                                |        | 740<br>1304  | 198<br>144   | 26<br>11 | 2,3 | 396<br>1246  | 101<br>126   | 25<br>10 | 2,5 |

Anzahl von Transduktanten und Vergleich prozentualer Cotransduktionshäufigkeit zwischen LT-2(=A)- und LD10(=B)-gezoenen HT13/4-Lysaten. Empfänger: SA4(P22) mit dem Genotyp: leuA124, araB9 und SU687(P22) mit dem Genotyp trpA52, cysB12, pyrF146.

#### 1.4. Die eop-Werte verschiedener Salmonellaphagen

Um eine weitere, auf genetischer Basis schlüssige Antwort auf die Frage zu erhalten, ob die Dezimierung der t.p., die aus einem LD-Lysat stammen, auf ein RM-System im klassischen Sinn zurückzuführen ist, wurde auf die Methode zurückgegriffen, mit der das Phänomen der Modifikation und Restriktion entdeckt wurde (vgl. Einl.), nämlich die Infektion von Zellen mit Phagen. Da sich der bisher ausschließlich verwendete Phage P22 bei eop-Vergleichen (vgl. Meth. 2.5.) als nahezu immun gegen die vorliegende Restriktion gezeigt hatte (v. Lieres, 1974), wurden 11 andere Salmonellaphagen daraufhin untersucht, ob sie nach Wachstum auf einem LD-Stamm von einem Wildtypstamm restringiert werden. Bei Richtigkeit der Hypothese, daß die Mutation im LD-Spender zum Ausfall der Fähigkeit zu modifizieren geführt hat, sollte ein Wildtypstamm die nicht modifizierte DNS wenigstens einiger Phagen restringieren. Es ist nicht zu erwarten, daß 11 Phagen, ähnlich wie der P22, gegen dieses Restriktionsenzym immun sind.

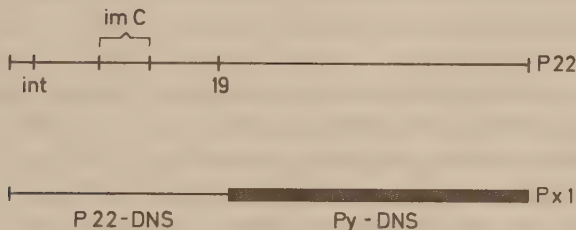
Von allen 11 Phagen wurden auf dem Stamm LD10 Lysate gezogen (vgl. Meth. 2.2.). Danach wurden die Phagen auf den Stämmen LD10 und LT-2 titriert und somit die eop-Werte aller 11 Phagen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Vergleichsplattierungen sind der Tabelle 1.4. (S. 63) zu entnehmen. Das Restriktionsspektrum der 11 LD-gezogenen Phagen reicht von voller Vermehrungsrate auf einem Wildtypstamm bis zu einem eop-Wert von  $1,5 \times 10^{-5}$ . Es erscheint somit als gesichert, daß in LD-Mutanten das Modifikationsgen ausgefallen ist.

Vergleicht man die Empfindlichkeit der einzelnen Phagen für das vorliegende Restriktionssystem mit dem jeweiligen Verwandtschaftsgrad zu P22, so zeigt sich keine deutliche Korrelation zwischen Verwandtschaft und Restriktionsverhalten. Eine kurze Charakterisierung der einzelnen Phagen soll das erläutern.

#### 1.4.1. Der Phage $Px_1c_2$

Dieser Phage ist ein Hybride der serologisch nicht verwandten und heteroimmunen Salmonellaphagen P22 und Py (Prell, 1970a und 1970b). Abb. 1.4.1. (Prell, 1975) zeigt, daß etwa  $1/3$  des  $Px_1c_2$  homolog ist dem Genomabschnitt zwischen den Genen *int* und *19* von P22.

Abb. 1.4.1.



Trotz der großen Homologiezone dieser beiden Phagen unterscheiden sie sich erheblich in ihrem Restriktionsverhalten. Man kann vermuten, daß entweder alle Schnittstellen für das Restriktionsenzym auf dem  $Px_1c_2$ -Genom auf dem Abschnitt liegen, der dem P22 nicht homolog ist, oder aber dieser nicht homologe Teil des P22 ein Gen trägt, das für ein Methylierungsenzym kodiert, welches auf dem  $Px_1c_2$ -Genom fehlt.

#### 1.4.2. Die Phagen KB und KBint

Der Phage KB ist ein allgemein transduzierender Phage, der sich vom P22 durch seine Plaquemorphologie, Transduktionshäufigkeit, Immunität, Antiserumspezifität und Hitzesensibilität unterscheidet (Boro und Brenchley, 1971). KB reagiert sehr empfindlich auf Hitze und ist somit der Boyd'schen Gruppe B zuzuordnen, im Gegensatz zum P22, der aufgrund seines hitzestabilen Verhaltens der Boyd'schen Gruppe A angehört (vgl. 1.4.4.). Da es sich bei den genannten Unterschieden zwischen KB und P22 um wesentliche Phagenfunktionen handelt, ist der Phage KB nicht verwandt mit P22. Auch die Sensibilität gegen das Restriktionsenzym unterscheidet sich wesentlich von der des P22. KB gehört zu den empfindlichsten aller hier untersuchten Phagen.

Einen ähnlichen eop-Wert wie KB, zeigt auch der Phage KBint, eine Integrationsmutante des Phagen KB.

Mit der DNS des Phagen KB wurde eine Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt. Die DNS des Phagen wurde, wie in Meth. 2.15. beschrieben, radioaktiv markiert, und nach Meth. 2.16. weiterverarbeitet, so daß auf den Gradienten, wie in Meth. 2.19. dargelegt, die reine, radioaktiv markierte DNS aufgetragen werden konnte. Gleichzeitig wurde als Referenz die DNS des Phagen P22, die nach Meth. 2.14. mit dem Isotop  $^{14}\text{C}$  radioaktiv markiert wurde, aufgetragen. Nach Zentrifugation der DNS im neutralen 5 bis 20%igen Sucrosegradienten (vgl. Meth. 2.19.) wurde der Gradient in Fraktionen von je 10 Tropfen auf Glasfaserfiltern aufgefangen und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen, wie in Meth. 2.20. und 2.21. beschrieben, bestimmt. Wie die Abb. 1.4.2. (S. 64) zeigt, liegt der Peak für beide Phagen an der gleichen Stelle. Das bedeutet, daß der Phage KB das gleiche Molekulargewicht besitzt, wie der Phage P22.

#### 1.4.3. Der Phage LP7

Dieser Phage wurde von Stocker (pers. Mitteilung), aus dessen Phagensammlung er stammt, nicht näher beschrieben. Er soll ein naher Verwandter des P22 sein. Die eop-Werte unterscheiden sich jedoch erheblich voneinander.

#### 1.4.4. Die Phagen A1a und A3

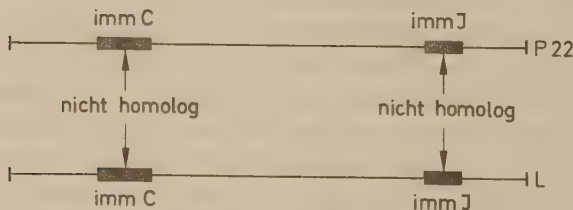
Beide Phagen gehören zu einer Gruppe von 12 hitzeresistenten Phagen, die aus lysogenen Zellen von *Salmonella typhimurium* isoliert wurden (Boyd, 1950), und später (Boyd und Bidwell, 1957) genauer charakterisiert wurden. Boyd (1950) hat Salmonellaphagen ganz allgemein in zwei große Gruppen eingeteilt, die Gruppe A und die Gruppe B. Sie unterscheiden sich hauptsächlich durch unterschiedliche Hitzeresistenz und Plaquemorphologie. Der Gruppe A wurden hitzestabile Phagen mit großen, trüben Plaques zugeordnet, der Gruppe B hitzelabile Phagen mit winzigen Plaques. Die Phagen A1a und A3 sind nahe verwandt mit dem ebenfalls der Gruppe A zuzuordnenden P22 und haben sehr ähnliches Transduktionsverhalten (Stocker, pers. Mitt.). Innerhalb der A-Phagen haben Boyd und Bidwell (1957) eine Unterteilung durchgeführt nach den Kriterien des Antigenmusters, der Wirtsspezifität und des Plaquecharakters. Der Phage A3 macht dabei insofern eine Ausnahme, als er sowohl bezüglich der Immunität, als auch der Plaquemorphologie von allen anderen A-Gruppen-Phagen abweicht, jedoch auch noch nicht den B-Gruppen-Phagen zuzuordnen ist. Auch bezüglich der Restriktion unterscheidet er sich vom Phagen A1a. Dieser hat den Restriktionsfaktor  $10^{-4}$ , der Phage A3 wird dagegen um das ca. 1000-fache weniger restringiert. Beide Phagen unterscheiden sich vom P22 in ihrer Empfindlichkeit gegenüber diesem Restriktionsenzym.

Vom Phagen A1a wurde, ebenso wie vom Phagen KB, eine Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt. Der methodische Ablauf ist mit dem in Kapitel 1.4.2. beschriebenen identisch. Die DNS dieses Phagen hat, wie die Abb. 1.4.3. (S. 64) zeigt, dasselbe Molekulargewicht wie P22. Dabei fällt der große Unterschied in der Sensibilität gegen die Restriktion bei ansonsten naher Verwandtschaft auf.

#### 1.4.5. Der Phage L

Dieser Phage wurde von Bezdek und Amati (1967) isoliert. Sein Verhalten bei 30-minütigem Erhitzen auf 78° reiht ihn in die Boyd'sche Gruppe A ein. Er zeigt die für P22 typische Morphologie. Bestimmte Schwanzproteine sind identisch. Das erklärt ähnliches Adsorptionsverhalten, ebenso serologische Verwandtschaft zu P22. Kahmann und Prell (1971) konnten weiter zeigen, daß nicht nur Proteine später, sondern auch früher Gen-Funktionen beider Phagen komplementierbar sind. Wie die Abb. 1.4.4. (Prell, 1975) zeigt, enthält das Genom des Phagen L große DNS-Abschnitte, die mit solchen von P22 homolog sind.

Abb. 1.4.4.



Diese großen Homologiezonen erklären auch die von den Autoren beobachtete hohe Rekombinationsfrequenz zwischen diesen beiden Phagen.

Für das in dieser Arbeit untersuchte Restriktionsenzym ist jedoch der Phage L ca. 100mal stärker anfällig als P22.

#### 1.4.6. Der Phage ES18h<sub>1</sub>

Kuo und Stocker (1970) gliedern diesen Phagen trotz abweichenden Verhaltens gegenüber Hitze in die Gruppe A der Boyd'schen Klassifizierung. Auch in anderen wesentlichen Merkmalen unterscheidet sich dieser Phage, eine host-range-Mutante des Phagen ES18, vom P22. Yamamoto (zitiert als persönliche Mitt. bei Kuo und Stocker, 1970) beobachtet jedoch, daß es zwischen P22 und ES18h<sub>1</sub> mit ziemlich großer Häufigkeit zur Rekombination kommt. Es scheinen somit doch größere Homologiestrecken vorhanden zu sein. Yamamoto vermutet, daß es sich auch bei diesem Phagen um ein Rekombinationsprodukt eines Phagen der Gruppe A und einem als Prophagen vorgelegenen Phagen der Gruppe B handelt, ebenso wie das bei dem Phagen Px<sub>1</sub>c<sub>2</sub> der Fall ist.

Der Phage ES18h<sub>1</sub> hat einen Restriktionsfaktor von  $10^{-1}$  und unterscheidet sich somit um den Faktor 10 von demjenigen des P22.

#### 1.4.7. Der Phage FO

Dieser Phage wurde zuerst von Felix und Callow (1943) beschrieben. Nach Wilkinson, Gemski und Stocker (1972) unterscheidet er sich wesentlich vom P22. Er ist jedoch, ebenso wie P22, immun gegen das hier beobachtete Restriktionsenzym.

#### 1.4.8. Der Phage 9NA

Dieser Phage wurde von Wilkinson et al. (1972) isoliert. Es handelt sich um einen virulenten Phagen, der nicht in der Lage ist zu transduzieren. Die Morphologie ist sehr unähnlich dem P22. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, hat der Phage 9NA im Gegensatz zum P22 einen langen Schwanz. Ebenso wie der dem P22 nicht verwandte Phage F0 wird auch dieser Phage vom vorliegenden Restriktionssystem nicht angegriffen.

#### 1.4.9. Der Phage SP6

Dieser Phage ist ein von Zinder (1961) isolierter, nicht transduzierender, P22 nicht verwandter Phage. Stocker (pers. Mitt.) vermutet, daß es sich um einen einsträngigen DNS-Phagen handelt. Wenn diese Annahme stimmt, wäre für die Immunität des SP6 gegen Restriktion die Beobachtung von Godson (1973) als Interpretation heranzuziehen, daß einsträngige DNS von der Restriktion nicht betroffen ist.

In den Kapiteln 1.4.1. bis 1.4.9. wurde gezeigt, daß die Empfindlichkeit gegen Restriktion durch das hier beobachtete Enzym für jeden Phagen typisch und offenbar nicht unmittelbar korreliert ist mit dem Grad der Verwandtschaft oder Homologie zu P22. Entweder ist die Anwesenheit der für das Enzym als Schnittstellenerkennungsregion spezifischen Basensequenz auf der DNS der untersuchten Phagen unabhängig von sonstigen Ähnlichkeiten zwischen den jeweiligen Phagen und P22, ja sogar unabhängig davon, ob mehr oder weniger lange Strecken der DNS durch Rekombination der einzelnen Phagen mit P22 in homologer Form vorliegen; oder aber der P22 trägt auf seinen mit diesen Phagen nicht homologen Abschnitten ein

Gen für ein Methylierungsenzym. Eine Methylierung der eigenen DNS, und somit ein Schützen vor der Restriktion, ist von den Phagen P1 (Arber und Dussoix, 1962) und Mu (Toussaint, 1976) bekannt. Dieses Problem wird in späteren Kapiteln ausführlich behandelt.

Mit dieser gewissermaßen "klassischen" Methode des eop-Vergleichs zur Messung von Restriktion wurden die Ergebnisse der Transduktion zwischen LD-Spender und LD-Empfänger bestätigt.

---

Tabelle 1.4.

| Phage                                | Titer auf Indikator  |                      | eop-Wert             |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                      | LD10                 | LT-2                 |                      |
| SP6:LD10                             | $2,6 \times 10^{10}$ | $3,5 \times 10^{10}$ | $1,3 \times 10^0$    |
| 9NA:LD10                             | $2,0 \times 10^8$    | $2,6 \times 10^8$    | $1,3 \times 10^0$    |
| FO:LD10                              | $3,6 \times 10^{10}$ | $1,7 \times 10^{10}$ | $4,0 \times 10^{-1}$ |
| ES18h <sub>1</sub> :LD10             | $2,3 \times 10^6$    | $4,4 \times 10^5$    | $1,9 \times 10^{-1}$ |
| A3:LD10                              | $8,9 \times 10^9$    | $8,4 \times 10^8$    | $9,0 \times 10^{-2}$ |
| L:LD10                               | $9,0 \times 10^{10}$ | $1,1 \times 10^9$    | $1,0 \times 10^{-2}$ |
| LP7:LD10                             | $2,2 \times 10^7$    | $3,5 \times 10^4$    | $1,5 \times 10^{-3}$ |
| A1a:LD10                             | $3,9 \times 10^{10}$ | $1,6 \times 10^7$    | $4,0 \times 10^{-4}$ |
| KB:LD10                              | $3,0 \times 10^9$    | $3,5 \times 10^5$    | $1,0 \times 10^{-4}$ |
| KBint:LD10                           | $5,6 \times 10^{10}$ | $1,7 \times 10^6$    | $3,0 \times 10^{-5}$ |
| Px <sub>1</sub> c <sub>2</sub> :LD10 | $6,4 \times 10^9$    | $1,0 \times 10^5$    | $1,5 \times 10^{-5}$ |

Titer von LD10-gezogenen Phagen auf den Stämmen LD10 und LT-2. Der Quotient: Titer LT-2/Titer LD10 ergibt den eop-Wert.

---

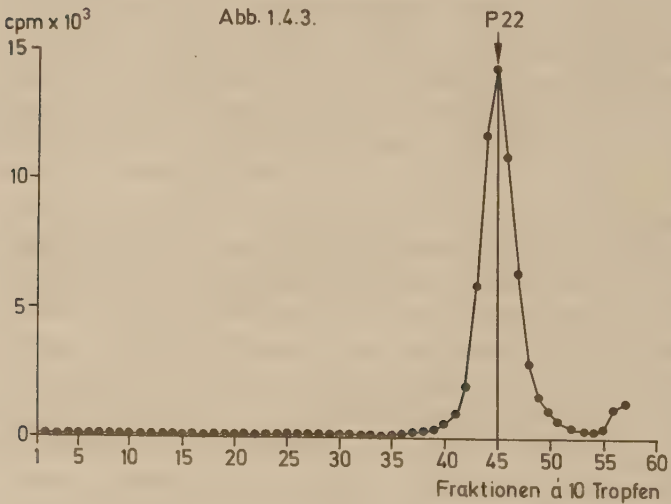
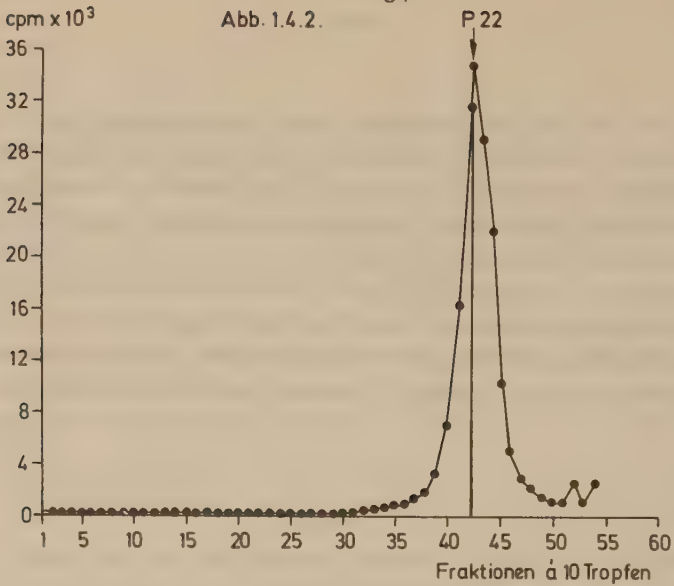


Abb. 1.4.2. und 1.4.3.

Molekulargewichtsbestimmungen von  $^3\text{H}$ -markierter DNS der Pha-gen KB (Abb. 1.4.2.) und A1a (Abb. 1.4.3.). Zentrifugation im neutralen Sucrosegradienten; Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierter P22-DNS als Referenz (die Lage dieses Peaks ist durch die Senkrechte angegeben); Sedimentationsrichtung von rechts nach links.

### 1.5. Untersuchung verschiedener Marker des S.typhimurium-Chromosoms auf ihren Grad der Restriktion

Die bisher beschriebenen Versuche haben erwiesen, daß dem Phänotyp schlechter Spendermutanten ein Defekt in den Genen eines Restriktions-Modifikationssystems zuzuordnen ist. Es handelt sich vermutlich um Modifikationsmutanten, die, wie schon in der Einleitung erwähnt, zur Rettung ihrer eigenen DNS auch zwangsläufig Restriktionsmutanten sind. Die Isolierung dieser Mutanten (v. Lieres, 1974) geschah über eine Transduktion mit spezieller Technik, der Sprühmethode (vgl. Meth. 2.24.), wobei als Empfänger eine lysogene HisB22-Auxotrophe verwendet wurde. Der Marker dieser Mutante eignet sich besonders gut, da er ein sehr gut transduzierbarer Marker ist, und somit Mutanten mit verringerter Transduktionshäufigkeit gut erkennbar sind. Daß nun ausgerechnet mit diesem Marker eine Modifikationsmutante isoliert werden konnte, war ein beachtlicher Zufall, da man annehmen kann, daß nicht jeder Marker durch einen Schnitt eines Restriktionsenzym so beeinträchtigt wird, daß sich das in einer drastisch verringerten Transduktionshäufigkeit ausdrückt. Es hätte ebensogut sein können, daß dem bei der Transduktion übertragenen Fragment mit dem Marker HisB22 die spezifische Basensequenz fehlt, die für die Bindung des Restriktionsenzym an die DNS und den darauf folgenden Doppelstrangschnitt nötig ist. Das Fragment wäre dann im Empfänger trotz fehlender Modifikation nicht restringiert worden und der Phänotyp des Low Donors nicht in Erscheinung getreten. Diese Überlegung führte zu der Frage, ob auch andere Marker des Salmonellachromosoms, ähnlich dem Marker HisB22, von der Restriktion betroffen sind und ob Chromosomenabschnitte gefunden werden können, die keine Schnittstelle tragen, was sich in einem Wildtyp-T/P-Wert ausdrücken sollte. Wie Kar-

tierungen von Schnittstellen gezeigt haben, (Nathans und Smith, 1975) ist sowohl die Anzahl, als auch die Lage restriktionsspezifischer Basensequenzen auf der DNS, z.B. eines Viruspartikels, nicht gleichmäßig verteilt. Das Simianvirus 40 wird beispielsweise vom Enzym HpaII nur einmal geschnitten. Die für dieses Enzym spezifische Basensequenz N-G-G-C-C-N kommt auf dem SV40-Genom somit nur einmal vor; die Enzyme HaeIII und EcoRII zerlegen dagegen die Virus-DNS in 16 Fragmente. Dabei sind diese 16 Schnittstellen nicht gleichmäßig über das Genom verteilt, sondern treten einerseits in eng beieinanderliegenden Gruppen auf, andererseits sind längere DNS-Abschnitte frei von Schnittstellen.

Um das *S.typhimurium*-Chromosom nach eventuellen weiteren Schnittstellen abzutasten, wurden 20 verschiedene, aus einer LD-Mutante stammende, also unmodifizierte Marker in Form von t.p. auf ihre Restriktion untersucht. Mit dem Phagen HT13/4 wurden Lysate gezogen (vgl. Meth. 2.2.), und zwar auf den Spendern LT-2 als Wildtyp und LD10, als einer stabilen Modifikationsmutante. Mit diesen Lysaten wurde in verschiedene Empfänger auf übliche Weise transduziert, die T/P-Verhältnisse bestimmt und jeweils Wildtyp- und LD-Werte verglichen (vgl. Meth. 2.8. und 2.9.). Die Ergebnisse dieser Transduktionen sind der Tabelle 1.5. (S. 69) zu entnehmen. Sie zeigt, daß es Marker gibt, die stärker restringiert werden als der Marker HisB22, daß andere Marker jedoch ganz offensichtlich keine Schnittstellen aufweisen, was sich in einem angenäherten Wildtyp-T/P-Wert ausdrückt. Die Unterschiede zwischen den Wildtyp-T/P-Werten der einzelnen Marker hängt mit der schon erwähnten unterschiedlichen, markerabhängigen Transduktionshäufigkeit zusammen.

Zwei Marker, *ilvA99* und *trpB2*, werden in gleicher Größenordnung restringiert, wie der Marker *HisB22*. Die Marker *metE338*, *cysE1709*, *phe47*, *proAB391*, *trpA52*, *cysB12* und *leu256* sind, verglichen mit den stark restringierten Markern, praktisch nicht von der Restriktion betroffen. Alle anderen untersuchten Marker zeigen mittlere Restriktionsfaktoren zwischen 7 und 18.

Abb. 1.5. (S. 68) zeigt die Position der untersuchten Marker auf dem Chromosom unter Markierung ihrer Restriktionsfaktoren. Die hohen Restriktionsfaktoren der Fragmente mit den Markern *HisB22*, *trpB22* und *ilvA99* können so interpretiert werden, daß hier Schnittstellen für das vorliegend betrachtete Restriktionsenzym liegen. Für eine Erklärung der Variation der Restriktionseffekte sind die im Kapitel 1.3. beschriebenen Phänomene heranzuziehen. Je weiter der Schnittpunkt von einem betrachteten Marker entfernt ist, desto geringer wird sein Einfluß auf die Rekombinationshäufigkeit sein.

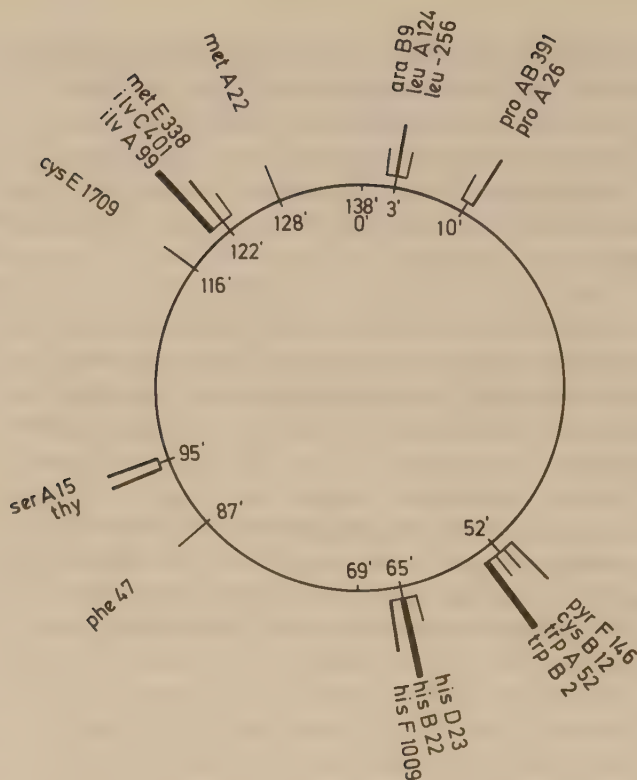


Abb. 1.5.

Positionen der über Transduktion auf ihren Restriktionseffekt untersuchten Marker auf der in 138 Minuten (Transferzeit bei Konjugation) eingeteilten Chromosomenkarte von *S. typhimurium* (nach Sanderson, 1972). Die Lage eng benachbarter Marker wurde der besseren Übersicht halber in der Zeichnung gespreitet.

- = Restriktionsfaktoren kleiner als 10
- = Restriktionsfaktoren von 10 - 18
- = Restriktionsfaktoren über 18

Tabelle 1.5.

| Empfänger    | L y s a t            |                      | Faktor |
|--------------|----------------------|----------------------|--------|
|              | HT13/4:LT-2          | HT13/4:LD10          |        |
| ilvA99 2)    | $1,4 \times 10^{-5}$ | $1,6 \times 10^{-7}$ | 88     |
| trpB2 2)     | $3,8 \times 10^{-6}$ | $6,0 \times 10^{-8}$ | 63     |
| HisB22 1)    | $1,3 \times 10^{-5}$ | $3,0 \times 10^{-7}$ | 43     |
| proA26 11)   | $3,8 \times 10^{-6}$ | $2,1 \times 10^{-7}$ | 18     |
| hisF1009 2)  | $3,8 \times 10^{-6}$ | $2,5 \times 10^{-7}$ | 15     |
| leuA124 5)   | $1,6 \times 10^{-5}$ | $1,3 \times 10^{-6}$ | 12     |
| ilvC401 6)   | $1,2 \times 10^{-5}$ | $1,0 \times 10^{-6}$ | 12     |
| thy 7)       | $1,8 \times 10^{-5}$ | $1,6 \times 10^{-6}$ | 11     |
| serA15 9)    | $3,2 \times 10^{-6}$ | $2,7 \times 10^{-7}$ | 11     |
| pyrF146 4)   | $2,6 \times 10^{-6}$ | $2,7 \times 10^{-7}$ | 10     |
| araB9 5)     | $1,5 \times 10^{-5}$ | $1,6 \times 10^{-6}$ | 9      |
| serA15 10)   | $2,8 \times 10^{-6}$ | $3,4 \times 10^{-7}$ | 8      |
| metA22 2)    | $9,9 \times 10^{-8}$ | $1,5 \times 10^{-8}$ | 7      |
| hisD23 8)    | $2,0 \times 10^{-6}$ | $2,7 \times 10^{-7}$ | 7      |
| leu256 13)   | $3,0 \times 10^{-5}$ | $5,2 \times 10^{-6}$ | 5      |
| cysB12 4)    | $1,5 \times 10^{-6}$ | $3,2 \times 10^{-7}$ | 5      |
| trpA52 4)    | $4,5 \times 10^{-6}$ | $1,4 \times 10^{-6}$ | 3      |
| proAB391 2)  | $2,0 \times 10^{-6}$ | $6,0 \times 10^{-7}$ | 3      |
| phe47 3)     | $3,0 \times 10^{-7}$ | $1,5 \times 10^{-7}$ | 2      |
| cysE1709 12) | $4,0 \times 10^{-6}$ | $2,2 \times 10^{-6}$ | 2      |
| metE338 6)   | $3,9 \times 10^{-6}$ | $4,7 \times 10^{-6}$ | 1      |

T/P-Werte und Restriktionsfaktoren LT-2- und LD10-gezogener HT13/4-Lysate in Empfängern mit verschiedenen Auxotrophien. Die Zahlen im Index bezeichnen die verschiedenen Stämme.

Dabei bedeutet: 1) His(P22); 2) SA1145(P22); 3) SA1134(P22); 4) SU687(P22); 5) SA4(P22); 6) SB109(P22); 7) T4/2(P22); 8) SR305(P22); 9) SA607(P22); 10) SA722(P22); 11) SU418(P22); 12) SA624(P22); 13) SR315(P22).

## 1.6. F-Duktion

Wie schon erwähnt, wurden die Grundlagen des molekularen Mechanismus der Restriktion und Modifikation zuerst von Arber und Dussoix und Dussoix und Arber (1962) am Beispiel der Infektion von Bakterienzellen mit Phagen beschrieben. Untersucht wurde jedoch auch die Wirkung der Restriktion auf bakterielle DNS und auf DNS, die nicht durch Infektion, sondern über Chromosomentransfer, F-Duktion, Transfektion und Transformation in die Zelle gelangte.

Colson und Colson (1971) beobachteten, daß das von ihnen gefundene S-Restriktionssystem in *S.typhimurium* F'lac-Episomen nur schwach beeinträchtigt, ganz im Gegensatz zum früher in *S.typhimurium* entdeckten LT-System, das F'lac-Episomen so stark angreift, daß auf diese Weise Restriktionsmutanten des LT-Systems isoliert werden konnten.

Sowohl bei F-Duktion als auch bei Transformation wird vermutlich einsträngige DNS transferiert (Siddiqui und Fox, 1973; Notani, 1974). Wie in der Einleitung erwähnt, wurde oft beobachtet, daß einsträngige DNS gegen Restriktion immun ist. In dieser Arbeit sollte zur weiteren Charakterisierung des LD-Systems untersucht werden, ob das postulierte RM-System durch F-Duktion transferierte bakterielle DNS im gleichen Maße wie durch Transduktion transferierte DNS abbaut, oder ob die DNS im Empfänger voll wirksam bleibt. Der Versuch wurde folgendermaßen durchgeführt: Aus dem *E.coli*-Stamm W 3747 (vgl. Mat. 1.1.2.) wurde das Episom F'lac in den *Salmonella*-Wildtypstamm LT-2 und in die Mutante LD10 überführt (vgl. Meth. 2.12.). Alle *Salmonella*-Stämme sind obligatorisch unfähig, Laktose zu vergären, wachsen also nicht auf ausschließlich Laktose enthaltendem Medium, wenn

sie nicht, zum Beispiel durch F-Duktion, das Gen für Laktoseabbau erhalten haben. Bei der Überführung des lac-Gens aus E.coli in S.typhimurium wurde mit Hilfe des Phagen T1 selektioniert, für den S.typhimurium resistent ist. Bei F-Duktionen zwischen zwei Salmonellastämmen wurde für die Selektion ein streptomycinsensibler Spender und ein streptomycinresistenter Empfänger benutzt (vgl. Meth. 2.12.).

Um einen eventuellen restriktiven Einfluß zu erkennen, wurden nach der Überführung des F-Episoms aus E.coli in die beiden erwähnten Salmonellastämme folgende F-Duktionen durchgeführt:

| Spender       | Empfänger             |
|---------------|-----------------------|
| 1. LT-2 F'lac | LT-2 Str <sup>r</sup> |
| 2. LT-2 F'lac | LD10 Str <sup>r</sup> |
| 3. LD10 F'lac | LD10 Str <sup>r</sup> |
| 4. LD10 F'lac | LT-2 Str <sup>r</sup> |

Lediglich bei der letzten F-Duktion kann ein LD-Effekt erwartet werden, da nur in diesem Fall unmodifizierte DNS in einen restriktiven Empfänger gelangt, die anderen F-Duktionen dienen als Kontrollen. Die Ergebnisse der F-Duktion zeigt die Tabelle 1.6. (S. 72).

Es ist ersichtlich, daß das F'lac-Episom nicht restringiert wird. Es gibt dafür drei Erklärungsmöglichkeiten. Erstens wäre es denkbar, daß das aus E.coli kommende Gen für Laktoseabbau keine Schnittstelle für das beobachtete System aufweist. Ruft man sich die Ergebnisse von Kapitel 1.5. in Er-

innerung, ist es durchaus möglich, daß das hier transferierte Gen für Laktoseabbau keine für das hier wirksame Restriktionssystem spezifische Schnittstelle trägt. Zweitens könnte die Beobachtung, daß einsträngige DNS nicht restringiert wird, hier anwendbar sein. Wenn auch gezeigt werden konnte, daß bestimmte Restriktionsenzyme Einzelstrang-DNS ebenso gut schneiden wie doppelsträngige DNS (Godson und Roberts, 1976), ist immerhin, wie schon erwähnt, auch beobachtet worden, daß Einzelstrang-DNS nicht restringiert wird. Da das Verhalten des LD-System-spezifischen Restriktionsenzyms unbekannt ist, kann im vorliegenden Fall nichts darüber gesagt werden, ob die Resistenz des F'lac-Episoms auf möglicherweise doppelstrangspezifisches Schneiden dieses Enzyms zurückzuführen ist, oder auf das oben erwähnte Fehlen einer Erkennungssequenz. Drittens ist es möglich, das Ergebnis als Widerspruch zu der Hypothese der Wirkung eines RM-Systems für die zu untersuchenden LD-Mutanten zu interpretieren. Nach allen bisherigen Ergebnissen scheint diese Schlußfolgerung jedoch unwahrscheinlich zu sein.

---

Tabelle 1.6.

| Spender    | Empfänger             |                       |
|------------|-----------------------|-----------------------|
|            | LT-2 Str <sup>r</sup> | LD10 Str <sup>r</sup> |
| LT-2 F'lac | $4,0 \times 10^{-2}$  | $4,1 \times 10^{-2}$  |
| LD10 F'lac | $3,6 \times 10^{-2}$  | $3,3 \times 10^{-2}$  |

F-Duktionshäufigkeiten für unmodifiziertes und modifiziertes F'lac-Episom bei F-Duktion in restriktiven und nicht-restriktiven Empfänger.

---

### 1.7. Molekulargewichtsbestimmung restringierter DNS

Mit der Messung von radioaktiv markierter, säurelöslicher DNS gelangen schon vor vielen Jahren die ersten Nachweise über den Abbau unmodifizierter Phagen-DNS in einem restriktiven Wirt. Die Autoren Dussoix und Arber (1962), Arber et al. (1963), Lederberg und Meselson (1964), Takano et al. (1966) und Takano et al. (1968) beobachteten bei dem Phagen  $\lambda$ , ebenfalls Uetake et al. (1964) mit dem Phagen  $\epsilon^{15}$ , Hattman (1964) mit sog. T\*-Mutanten der Phagen T2, T4 und T6 sowie Fukasawa (1964) mit der Mutante T\* des Phagen T4 die Freisetzung von Radioaktivität, welche die infolge Abbau säurelöslich gewordene DNS anzeigt. Die Experimente zeigen, daß z.B. beim Phagen  $\lambda$  der Abbau durch Restriktionsenzyme des K- und B-Systems bereits nach weniger als 5 Minuten einsetzt, überwiegend nach 8 bis 10 Minuten seinen Höhepunkt erreicht und nach spätestens 35 Minuten keinerlei Zuwachs an säurelöslichem Material mehr zu beobachten ist.

Der Abbau von Phagen-DNS in E.coli-Wirten deren K- bzw. B-Systeme unwirksam sind, wird von den Autoren mit extrem schwankenden Werten angegeben. Hattman (1964) und Fukasawa (1964) zeigten, daß nach 20 Minuten 5% der Phagen-DNS in einem diese DNS nicht angreifenden Wirt säurelöslich wurde. Takano et al. (1966) dagegen beobachteten den extrem hohen Abbau von 95% bei in vitro-Versuchen in Kontroll-Inkubationen von  $\lambda$ -DNS mit zellfreiem Extrakt, wobei entweder modifizierte DNS oder Extrakte von nichtrestriktiven Bakterien verwendet wurden. Dieser durch unspezifische Nucleasen hervorgerufene Befund läßt sich durch veränderte Versuchsbedingungen verbessern. Alle in vivo-Versuche, d.h. Infektion lebender Zellen und Messung des säurelöslichen, ausgeschiedenen Materials und Experimente mit zellfreiem

Extrakt, zeigen mehr oder weniger starken Abbau der beobachteten DNS durch unspezifische Nucleasewirkung auch unter nichtrestriktiven Bedingungen.

1975 inkubierten Shibata und Ando unmodifizierte und modifizierte DNS des *Bacillus subtilis*-Phagen Ø105C mit zellfreiem *B. subtilis*-Extrakt und bestimmten anschließend mit der Methode der Sucrosegradientenzentrifugation die Größe der Abbauprodukte unmodifizierter Phagen-DNS *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls durch Sucrosegradientenzentrifugation der Abbau unmodifizierter Phagen-DNS gemessen, jedoch wurde nicht mit zellfreiem Extrakt, sondern *in vivo* gearbeitet, wobei lebende Zellen infiziert, diese nach einer bestimmten Inkubationszeit aufgeschlossen und aufgearbeitet wurden. Anschließend erfolgte eine Größenbestimmung der radioaktiv markierten DNS.

Für dieses Experiment war der Phage A1a (vgl. 1.5.) wegen seines hohen Restriktionsfaktors ein günstiges Substrat. Die A1a-Phagen-DNS wurde wie in Meth. 2.15. beschrieben markiert, und zwar wurde für den Nachweis des Abbaus unmodifizierter DNS das A1a-Lysat auf dem modifikationsdefekten Stamm LD1.1 gezogen. Diese Mutante ist eine aus dem Stamm T4/2 durch Mutagenese mit NG (vgl. Material 1.1.15.) entstandene LD-Mutante und eignete sich somit als Wirt für die radioaktive Markierung, wenn die Phagen-DNS unmodifiziert sein sollte. Für die Durchführung von Kontrollen wird aber auch modifizierte Phagen-DNS benötigt. Dazu wurde der modifizierende und restringierende Stamm T4/2 mit dem Phagen A1a infiziert und wie in Methoden 2.15. beschrieben, radioaktiv markiert.

Die Empfänger T4/2 und LD1.1 wurden mit diesen radioaktiv markierten Phagen infiziert, und zwar in folgenden vier Parallelansätzen:

| Phage        | Empfänger |
|--------------|-----------|
| 1) A1a:T4/2  | T4/2      |
| 2) A1a:T4/2  | LD1.1     |
| 3) A1a:LD1.1 | LD1.1     |
| 4) A1a:LD1.1 | T4/2      |

Wie in Meth. 2.17. beschrieben, wurde das Phagenwachstum durch Zugabe von KCN bei der Infektion synchronisiert. Die Abb. 1.4.3. (S. 64) in Kapitel 1.4. zeigt, daß der Phage A1a dasselbe Molekulargewicht wie der Phage P22 hat. Als Referenz wurde daher P22, wie in Methoden 2.14. beschrieben, mit dem Isotop  $^{14}\text{C}$  markiert. In den Fällen 1 - 3, den Kontrollen, sollte die DNS des Phagen A1a im Peak-Bereich der P22-DNS erscheinen, da entweder die Phagen-DNS modifiziert ist, wie in den Ansätzen 1 und 2, oder der Empfänger restriktionsdefekt ist, wie in den Experimenten 2 und 3. Lediglich im Versuch vier, bei einer Infektion des restriktiven Stammes T4/2 mit unmodifizierten, auf dem Stamm LD1.1 gewachsenen Phagen, kann eine Verschiebung des Peaks in die Richtung des Miniskus erwartet werden (vgl. Meth. 2.19.), da die DNS durch den Abbau kleiner geworden sein sollte.

Die Inkubation der Stämme T4/2 und LD1.1, das Stoppen und die Extraktion der DNS, verlief wie in Methoden 2.17. und 2.18. beschrieben. Zur Größenbestimmung der reextrahierten Phagen-DNS wurden Proben der gereinigten  $^3\text{H}$ -markierten DNS aus allen vier Ansätzen, wie in Methoden 2.19. beschrieben, zusammen mit  $^{14}\text{C}$ -markierter P22-Referenz-DNS zentrifugiert. Die DNS-Moleküle befinden sich nun je nach Molekulargewicht

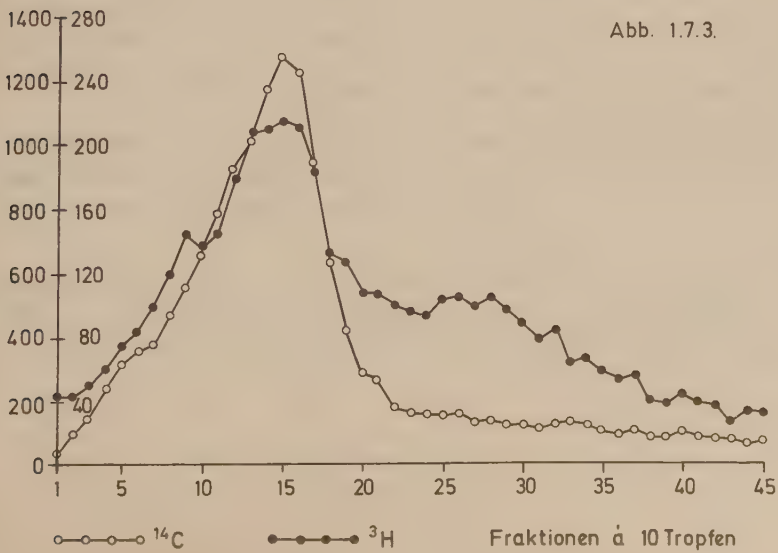
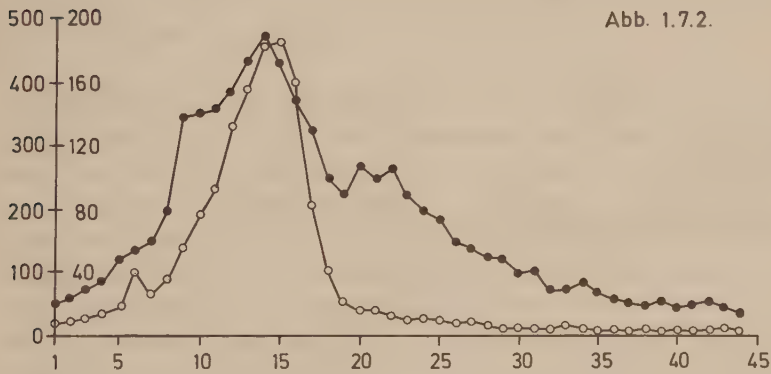
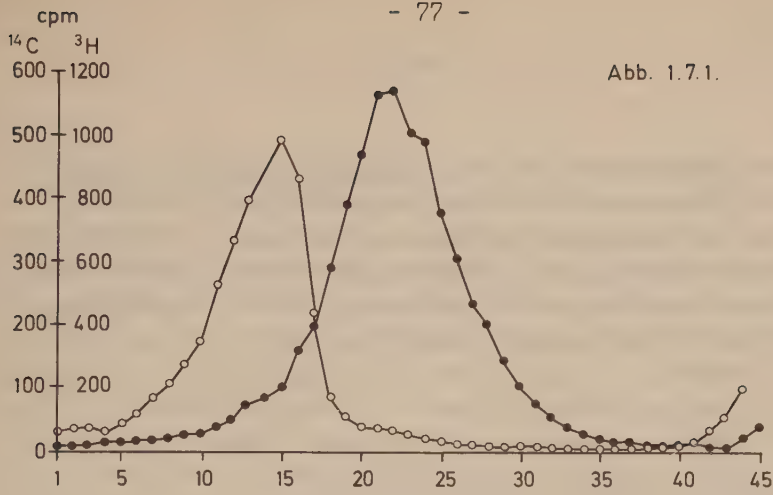
in bestimmten Zonen des linearen Sucrosegradienten. Um die Position des radioaktiven Materials im Gradienten zu bestimmen, wird, wie in Methoden 2.20. beschrieben, der Gradient in Fraktionen zu je 10 Tropfen auf Glasfaserfilter aufgefangen und die Radioaktivität der einzelnen Filterblättchen gemessen. Nach einer sog. "spill-over"-Korrektur, die durch die Verwendung der beiden unterschiedlichen Isotopen  $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$  erforderlich ist, erfolgt die graphische Darstellung (vgl. Meth. 2.21.).

Die Abb. 1.7.1. bis 1.7.3. (S. 77 und 78) zeigen die Ergebnisse dieses Experiments.

Abb. 1.7.1. demonstriert zweifelsfrei den Abbau der unmodifizierten DNS des Phagen A1a nach Infektion des restringierenden Wirts T4/2. Das mittlere Molekulargewicht der Restriktionsfragmente läßt sich nach der in Meth. 2.21. erwähnten Formel berechnen und ist etwa halb so groß wie das von P22, das  $2,7 \times 10^7$  Daltons beträgt. Wie die Abb. 1.7.2. und 1.7.3. zeigen, sind unspezifische Nucleasewirkungen bei den Kontrollen zu beobachten. Wenn jedoch auch leichtere Abbauprodukte zu erkennen sind, so liegt doch der Hauptteil der DNS-Moleküle im Bereich des Referenzpeaks. Kein Kontrollversuch zeigt dagegen die quantitative Verschiebung allen Materials in einen leichteren Peak, wie das beim Ansatz mit unmodifizierter DNS in einem restriktiven Wirt zu beobachten ist. Ganz offensichtlich ist der Stamm LD1.1 nicht in der Lage, spezifisch zu restringieren. Die Kontrollinkubation des Stammes T4/2 mit dem Phagen A1a:T4/2 (nicht dargestellt), zeigte qualitativ das gleiche Ergebnis wie die beiden gezeigten Kontrollen der Abb. 1.7.2. und 1.7.3.

Die Kurve in Abb. 1.7.1. ist gut vergleichbar mit den von Shibata und Ando (1975) gezeigten Kurven restringierter  $\phi 105\text{C}$ -Phagen-DNS und dem Abbau-Peak, den Murray et al. (1973) für unmodifizierte WT- $\lambda$ -DNS erhielten, bei Inkubation der DNS mit gereinigtem Restriktionsenzym.

Dieser Versuch zeigt somit, daß Phagen-DNS aus einem LD-Spenderstamm bei Infektion eines WT-Stammes von diesem restringiert wird.



Molekulargewichtsbestimmungen modifizierter oder unmodifizierter,  $^3\text{H}$ -markierter DNS des Phagen A1a nach Infektion restriktiver oder nichtrestriktiver Zellen und anschließender Reextrahierung. Zentrifugation im neutralen Sucrosegradienten; Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierter H5-DNS als Referenz; Sedimentationsrichtung von rechts nach links.

Abb. 1.7.1.

Unmodifizierte DNS in restriktivem Wirt.

Abb. 1.7.2.

Modifizierte DNS in restriktivem Wirt.

Abb. 1.7.3.

Modifizierte DNS in nichtrestriktivem Wirt.

## 2. Identifizierung des Systems

1971 wurde, wie schon erwähnt, von den Autoren Colson und Colson ein zweites Restriktions-Modifikationssystem bei *S.typhimurium* entdeckt, nachdem Colson et al. 1969 bereits ein von ihnen "LT" genanntes System beschrieben hatten. Das neue System nannten die Autoren S-System und zeigten, daß es die gleiche Position auf dem Chromosom von *S.typhimurium* hatte wie das K-System auf dem *E.coli*-Chromosom. Durch Hybride von *S.typhimurium* und *E.coli* konnte weiterhin gezeigt werden, daß das S-System sowohl mit dem K- als auch dem B-System in *E.coli* komplementierbar und somit mit diesen Systemen homolog war.

1974 entdeckten jedoch Colson und v.Pel an Hybriden zwischen *S.typhimurium* Hfr und *E.coli* F<sup>-</sup>-Stämmen, daß das S-System aus zwei zwar eng benachbarten, aber funktionell unterschiedlichen Systemen besteht, die auf den Phagen  $\lambda$  in additiver Weise restringierend und modifizierend wirken. Bei den Kreuzungen zwischen *S.typhimurium* und *E.coli* wurden, wegen der engen Nachbarschaft, immer die Gene für beide, nunmehr SA und SB genannten Systeme gemeinsam übertragen. Da die Selektion auf das S-System über den Phagen L erfolgte, konnte das SB-System nicht gefunden werden, da es nur  $\lambda$ , nicht aber L restringiert. Für die Restriktion des Phagen L ist das SA-System verantwortlich.

Die Autoren kartierten beide Systeme und zeigten, daß die Marker  $\text{pyrB-rm}_{\text{SA}}\text{-rm}_{\text{SB}}\text{-serB}$  in dieser Weise von *serB* aus gegen den Uhrzeigersinn angeordnet sind.

Der eop-Vergleich verschiedener Phagen (vgl. Erg. 1.4. und Tab. 1.4.) in dieser Arbeit zeigt, daß der Phage L:LD10, also ein an den für das LD10-System spezifischen Basensequen-

zen unmodifizierter L-Phage, 100mal schlechter auf einem restriktiven als auf einem nichtrestriktiven Stamm wächst. Es ist dies der gleiche Faktor, mit dem dieser Phage vom SA-System restrinigt wird (Colson und Colson, 1971). Möglicherweise handelt es sich bei dem Stamm LD10 um die von Colson und v. Pel (1974) beschriebene SA-restriktions- und modifikationsdefekte Mutante. Beide Systeme greifen nicht den P22, jedoch den Phagen L und diesen in gleicher Effizienz an.

## 2.1. Vergleich des LD10-Systems mit dem SA-System durch die Bestimmung von eop-Werten LD10-gezogener Phagen auf einer SA-System-Mutante

Eine Prüfung dieser Hypothese ist möglich, wenn man das Restriktionsmuster einiger der unter Erg. 1.4. beschriebenen Phagen untersucht, wenn diese auf dem Stamm LD10 gezogen wurden und dann vergleichend auf dem Wildtypstamm LT-2 und den restriktions- und modifikationsdefekten Stämmen LD10 und 4423 (vgl. Mat. 1.1.1.) titriert und die eop-Werte bestimmt werden (vgl. Meth. 2.5.). Der Stamm 4423 hat den Genotyp  $r_{SA}^- m_{SA}^-$ . Wie in Kapitel 1.4. beschrieben, werden die verschiedenen Phagen mit unterschiedlicher Effizienz restringiert, wenn an der LD10-spezifischen Basensequenz die Modifikation fehlt. Wenn das LD-System dem SA-System entspräche, müßten bei diesem Versuch LD10-gezoogene Phagen auf dem Stamm 4423 mit der gleichen Wirksamkeit vermehrt werden wie auf dem Stamm LD10 und damit die individuellen eop-Werte, verglichen mit einer Plattierung auf einem restriktiven Wildtypstamm, dem Stamm LT-2, ebenfalls gleich groß sein.

Die in der Tab. 2.1.1. (S. 82) dargestellten Ergebnisse untermauern die Hypothese, daß im Stamm LD10 die Gene  $r_{SA}$

und  $m_{SA}$  mutiert sind. Neun von zehn untersuchten Phagen zeigen denselben eop-Wert auf den Stämmen 4423 und LD10. Der Unterschied um den Faktor 10 bei den Phagen LP7 und SP6 ist unverständlich. Bei dem Phagen mod9 handelt es sich um eine Mutante des P22, die für die LD-Restriktion sensibel ist. Sie wird im Kapitel 4.1. näher beschrieben werden. Die Phagen ES18h<sub>1</sub> und FO plattieren nicht auf dem Stamm 4423. Möglicherweise werden sie durch den für diese Phagen homoimmunen Prophagen Fels 2 an ihrer Vermehrung gehindert. Es wurde deshalb für die Plattierung dieser beiden Phagen der bezüglich dieses Phagen prophagenfreie Stamm 4420 benutzt, der ebenfalls den Genotyp  $r_{SA}^- m_{SA}^-$  trägt (vgl. Mat. 1.1.1.).

## 2.2. Bestimmung der eop-Werte von fünf 4423-gezogenen Phagen auf dem Stamm LD10

Zur Sicherung der Ergebnisse des vorigen Versuchs wurde mit fünf der hier untersuchten Phagen ein reziproker eop-Vergleich durchgeführt. Dazu wurden Phagenlysate auf dem Stamm 4423 gezogen (vgl. Meth. 2.2.) und auf den gleichen Indikatoren wie im vorhergehenden Versuch plattiert. Tab. 2.1.2. zeigt, daß auch hier gleiche eop-Werte für die Stämme LD10 und 4423 erhalten werden. Der Unterschied der eop-Werte des Phagen KB:4423 um den Faktor 10 ist ebensowenig erklärbar wie der Unterschied für die Phagen LP7 und SP6 im vorhergehenden Versuch und kann möglicherweise mit der von Arber (1965) beobachteten Labilität der quantitativen Wirkung der Restriktion erklärt werden, ebenso wie die eop-Schwankungen einiger Phagen zwischen diesem und dem vorhergehenden Versuch.

Grundsätzlich sprechen jedoch die Ergebnisse beider Experimente eindeutig für eine Identität des LD10-Systems mit dem SA-System.

Tabelle 2.1.1.

| Phage                    | I n d i k a t o r |                      |                      | eop-Werte            |                      |
|--------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                          | LT-2              | LD10                 | 4423 (4420)*         | LT-2/LD10            | LT-2/4423            |
| FO:LD10                  | $3,4 \times 10^9$ | $4,0 \times 10^9$    | $(5,4 \times 10^9)$  | $8,5 \times 10^{-1}$ | $6,2 \times 10^{-1}$ |
| 9NA:LD10                 | $1,0 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^8$    | $1,8 \times 10^8$    | $6,2 \times 10^{-1}$ | $5,5 \times 10^{-1}$ |
| LP7:LD10                 | $1,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^6$    | $2,8 \times 10^5$    | $3,3 \times 10^{-2}$ | $3,5 \times 10^{-1}$ |
| mod9:LD10                | $5,1 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$    | $1,6 \times 10^8$    | $3,9 \times 10^{-1}$ | $3,1 \times 10^{-1}$ |
| A3:LD10                  | $5,2 \times 10^9$ | $1,8 \times 10^{10}$ | $1,4 \times 10^{10}$ | $2,8 \times 10^{-1}$ | $3,7 \times 10^{-1}$ |
| SP6:LD10                 | $1,7 \times 10^7$ | $5,7 \times 10^7$    | $1,2 \times 10^7$    | $2,9 \times 10^{-1}$ | $1,4 \times 10^0$    |
| L:LD10                   | $1,1 \times 10^9$ | $9,0 \times 10^{10}$ | $1,0 \times 10^{11}$ | $1,3 \times 10^{-2}$ | $1,1 \times 10^{-2}$ |
| ES18h <sub>1</sub> :LD10 | $3,2 \times 10^7$ | $2,7 \times 10^9$    | $(3,1 \times 10^9)$  | $1,1 \times 10^{-2}$ | $1,0 \times 10^{-2}$ |
| KB:LD10                  | $6,7 \times 10^5$ | $2,1 \times 10^8$    | $2,7 \times 10^8$    | $3,1 \times 10^{-3}$ | $2,4 \times 10^{-3}$ |
| A1a:LD10                 | $5,9 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^{10}$ | $2,0 \times 10^{10}$ | $1,9 \times 10^{-3}$ | $2,9 \times 10^{-3}$ |

Titer LD-gezogener Phagen auf dem r<sup>-</sup>SA<sup>m-</sup>SA-Stamm 4423, LD10 und LT-2, sowie Bestimmung von eop-Werten

\*Titer in Klammern wurden auf diesem Indikator bestimmt

Tabelle 2.1.2.

| Phage     | I n d i k a t o r |                      |                      | eop-Werte            |                      |
|-----------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|           | LT-2              | LD10                 | 4423                 | LT-2/LD10            | LT-2/4423            |
| mod9:4423 | $2,6 \times 10^9$ | $2,0 \times 10^{10}$ | $2,7 \times 10^{10}$ | $1,3 \times 10^{-1}$ | $9,6 \times 10^{-2}$ |
| A3:4423   | $1,0 \times 10^9$ | $8,8 \times 10^9$    | $1,1 \times 10^{10}$ | $1,1 \times 10^{-1}$ | $9,0 \times 10^{-2}$ |
| L:4423    | $2,3 \times 10^8$ | $4,1 \times 10^{10}$ | $6,7 \times 10^{10}$ | $5,6 \times 10^{-3}$ | $3,4 \times 10^{-3}$ |
| A1a:4423  | $3,3 \times 10^6$ | $4,8 \times 10^9$    | $7,3 \times 10^9$    | $6,8 \times 10^{-4}$ | $4,5 \times 10^{-4}$ |
| KB:4423   | $5,0 \times 10^4$ | $2,0 \times 10^9$    | $2,4 \times 10^8$    | $2,5 \times 10^{-5}$ | $2,0 \times 10^{-4}$ |

Titer 4423-gezogener Phagen auf 4423, LD10 und LT-2, sowie Bestimmung von eop-Werten

### 2.3. Kartierung durch Cotransduktion

Über Cotransduktion läßt sich prüfen, ob das LD10-System an derselben Stelle kartiert wie das SA-System. Das SA-System ist dem Marker  $\text{pyrB}$  unmittelbar benachbart (Colson und v.Pel, 1974) und wird von dem Phagen P22 mit einer Häufigkeit von 2 - 3 % mit diesem Marker cotransduziert.

Für die Kartierung wurde der Phage HT13/4 auf dem Stamm LD10 gezogen. In diesem Lysat gebildete t.p. können somit das Gen  $r^{-m-}$  auf einen Empfängerstamm übertragen, der für den Marker  $\text{pyrB96-auxotroph}$  ist; es wird somit auf den Marker  $\text{pyr}^{+}$  selektiert. Um bei der späteren Prüfung auf die Gene der Modifikation und Restriktion den Ausschluß durch die sie-Systeme (vgl. 1.1.) zu umgehen, wurde der Stamm vor der Transduktion mit der Phagenmutante  $\text{sie1}$  (vgl. Mat. 1.2.1.) lysogenisiert. Ein bestimmter Prozentsatz von Transduktanten könnte nun, vorausgesetzt die LD- und SA-Systeme haben die gleiche Lokalisation auf dem Chromosom, gleichzeitig mit der Übertragung des Markers  $\text{pyr}^{+}$  den Marker  $r^{-LDm-LD}$  erhalten haben. Um das zu testen, wurden  $\text{pyr}^{+}$ -Transduktantenkolonien abgeimpft und über den in Methoden 2.22. beschriebenen Strichtest daraufhin überprüft, ob sie noch in der Lage waren, den unmodifizierten Phagen KB zu restringieren. Die Verwendung des Phagen KB bot sich für den Strichtest an, da er einerseits heteroimmun zum Phagen P22 ist, eine Notwendigkeit, die sich durch die Verwendung lysogener Empfängerstämme bei der Transduktion ergibt, und andererseits einen hohen Restriktionseffekt für das SA-System zeigt (vgl. 1.4.). Aus der Tab. 2.3. (S.84) ist ersichtlich, daß von 359  $\text{pyr}^{+}$ -Transduktanten 8 Kolonien nicht mehr fähig sind zu restringieren, d.h. diese Kolonien haben durch die Transduktion mit dem Marker  $\text{pyr}^{+}$  gleichzeitig den Marker  $r^{-LDm-LD}$

erhalten. Das ergibt eine Cotransduktionshäufigkeit von 2,2%. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Colson und v.Pel (1974) gefundenen Wert der Cotransduktionshäufigkeit der Gene  $r_{SA}^m SA$  mit dem Marker  $pyr137$ .

LD-Spendermutanten haben somit den Genotyp  $r_{SA}^m SA$ .

Tabelle 2.3.

| Phage  | Spender<br>(Genotyp)                  | Empfänger<br>(Genotyp)                       | Anzahl<br>der ge-<br>testen Ko-<br>lonien | Anzahl der<br>Kolonien<br>mit Spen-<br>der-Geno-<br>typ bezügl.<br>$r/m$ | Cotrans-<br>duktions-<br>häufig-<br>keit |
|--------|---------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| HT13/4 | LD10<br>$(r_{LD10}^m LD10, pyrB96^+)$ | SH480(sie1)<br>$(r_{LD10}^m LD10, pyrB96^-)$ | 359                                       | 8                                                                        | 2,2%                                     |

Bestimmung der Cotransduktionshäufigkeit für die Marker  $pyrB96^+$  und  $r_{LD10}^m LD10$

### 3. Anwendung der Sprühmethode zur Isolierung weiterer RM-Mutanten

Als Nebenaspekt dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Sprühmethode (vgl. Meth. 2.24.), mit der v. Lieres (1974) die vorliegenden Modifikations- und Restriktionsmutanten isolierte, ein geeigneter Weg sein könnte, nach weiteren Restriktionssystemen in *Salmonella typhimurium* zu suchen. Beim Sprühen mit dem Empfänger HisB22 wurde zufällig eine Mutante des SA-Systems isoliert, da dieser Marker durch einen Restriktionsschnitt dieses Systems relativ stark beeinträchtigt wird. Beim Sprühen anderer Empfänger mit anderen Auxotrophien hätte es sein können, daß dabei t.p. beobachtet worden wären, die durch Restriktionsenzyme mit anderen Schnittstellenspezifitäten degradiert worden wären. Die nachfolgend beschriebenen Experimente waren als Ansatzmöglichkeit für weitere Arbeiten gedacht und erheben nicht den Anspruch auf Vollständigkeit.

Für die Isolierung möglicher Restriktionsmutanten wurde der Wildtypstamm LT-2 mutagenisiert, wie in Meth. 2.23. dargestellt. Der Anteil auxotropher Zellen (vgl. Meth. 2.23.) errechnete sich mit 18%. Die mutagenisierte Kultur wurde, wie in Meth. 2.24. beschrieben, weiterbehandelt. Im Gegensatz zu früheren Isolierungen von LD-Mutanten (v. Lieres, 1974) wurde diesmal nicht mit dem Empfänger HisB22(P22) gesprüht, der damals wegen des für diesen Marker typischen hohen T/P-Wertes verwendet wurde, sondern mit den Empfängern SA4(P22) und SA1145(P22). Dabei wurde im ersten Fall auf leuA124<sup>+</sup>-Transduktanten, im zweiten Fall auf proAB391<sup>+</sup>-Transduktanten selektiert. Für die Selektion auf diesen Marker im Stamm SA1145 wurden, wegen der zusätzlichen Auxotrophien dieses Stammes, die Aminosäuren Methionin, Tryptophan, Histidin, Isoleucin und Valin in den angegebenen Konzentrationen sup-

plementiert (vgl. Mat. 1.3.5.), so daß lediglich t.p., die den Marker proAB391 tragen, beobachtet werden. Dieser Marker zeigt für das SA-System nahezu keine Restriktion (vgl. 1.5., Tab. 1.5.); der Marker leuA124 wird um den Faktor 12 restringiert, und zeigt somit auch nicht die für eine Transduktion maximale Restriktion um den Faktor  $10^{-2}$ . Für beide Stämme liegt die Wildtyptransduktionshäufigkeit hoch genug (vgl. Tab. 1.5., S. 69), um mögliche LD-Mutanten auf den Sprühplatten von Kolonien zu unterscheiden, die mit WT-Häufigkeit transduziert werden.

Bei der Selektion auf den Marker proAB391 konnte auf 60 gesprühten Platten mit durchschnittlich 100 gestempelten Kolonien keine gefunden werden, die signifikant weniger oder gar keine proAB-Transduktanten mehr gebildet hätten. Falls es in *Salmonella typhimurium* noch ein unbekanntes RM-System geben sollte, greift es diese t.p. ebensowenig an, wie das SA-System.

Bei der Selektion auf den Marker leuA124 waren auf 33 Platten mit durchschnittlich 100 gestempelten Kolonien 19 Kolonien zu beobachten, die deutlich weniger oder gar keine Transduktanten in dem Lysisareal der gestempelten Kolonien gebildet hatten. Das entspricht 0,6 % aller getesteten Kolonien. 9 Kolonien erwiesen sich nach einem Tropftest, bei dem der Phage H5 auf 0,1ml ÜK der zu testenden, in Weichagar plattierten Kolonie aufgetropft wurde (vgl. Meth. 1.1. und Mat. 1.3.3.), als phagenresistent. Auf den verbleibenden 10 zu testenden Stämmen wurden mit dem Phagen H5 Lysate gezogen (vgl. Meth. 2.2.). Drei dieser Stämme vermehrten den Phagen nur sehr schlecht und wurden nicht mehr weiterverwendet. Mit den restlichen sieben Lysaten, die nun t.p. enthalten sollten, wurden die Empfänger SA4(P22) und HisB22(P22) transduziert und die T/P-Werte bestimmt (vgl. Meth. 2.8. und 2.9.). Einen Überblick über die Isolierung gibt die Ta-

belle 3.1. (S. 88). Die Ergebnisse für die sieben geprüften Stämme sind aus der Tabelle 3.2. (S. 88) abzulesen. Bei der Untersuchung durch die Transduktion zeigte sich, daß die T/P-Werte aller LDK-Stämme nicht vom T/P-Wert des Stammes LT-2 abweichen, wenn der Empfänger für den Marker Leucin auxotroph ist. Es ist kein LD-Effekt zu beobachten. Bei gleichzeitiger Transduktion des Stammes HisB22(P22) mit denselben Lysaten kann für t.p., die in dem neu isolierten Stamm LDK7 gebildet worden sind, eine klassische Reduktion des T/P-Wertes um den Faktor  $10^{-2}$  beobachtet werden, und auch die Stämme LDK1 bis 6 bilden t.p., die im Empfänger nicht mehr mit WT-Häufigkeit zu rekombinativen Transduktanten führen.

Die LDK-Stämme wurden zwar über den Marker leuA124 selektiert, die Reduktion der T/P-Werte wurde jedoch erst bei der Transduktion des Markers HisB22 deutlich. Dieses sich hier zeigende RM-System würde somit zwar den Marker leuA124 in dem Maße angreifen, daß auf Sprühplatten eine Reduktion der t.p. erkennbar ist, bei einem Test über Transduktion verschwindet jedoch dieser Unterschied; der Marker HisB22 ist dagegen von diesem System so stark betroffen, daß sich die Unterschiede auch in einer Transduktion manifestieren.

Um schnell zu testen, ob das hier selektierte RM-System mit dem SA-System identisch ist, wurde der Phage A1a:LD10 auf den Stämmen LDK7, LD10 und LT-2 titriert und die eop-Werte berechnet (vgl. Meth. 2.5.). Dabei ergab sich, wie aus Tabelle 3.3. (S. 89) ersichtlich ist, daß das LDK7-System möglicherweise nicht identisch ist mit dem LD-, respektive SA-System. Der Stamm LDK7 restringiert den Phagen A1a, wenn er an den LD10-spezifischen Sequenzen unmodifiziert ist, was sich in dem LD10/LDK7-eop-Wert von  $10^{-3}$  ausdrückt. Das bedeutet, daß im Stamm LDK7 keine  $r_{SA}^{-}$ -Mutation vorliegen kann. Für end-

gültige Aussagen sollten jedoch, wie in Erg. 2.1. und 2.2. demonstriert, mehrere Phagen getestet werden. Es hat aber immerhin den Anschein, als ob der DNS-Abschnitt mit dem Gen HisB noch für ein weiteres, vom SA-System verschiedenes RM-System Substrat wäre, möglicherweise für das LT-System.

Wie die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, könnte es bei Einsatz verschiedener Auxotrophien sinnvoll sein, mit der Sprühmethode nach weiteren Restriktionssystemen in *Salmonella typhimurium* zu suchen.

---

Tabelle 3.1.

Zahl der isolierten Kolonien: 19 = 0,6% aller getesteten Kolonien  
 davon phagenresistent : 9  
 schlechte Phagenvermehrung : 3

---

Tabelle 3.2.

| Phage   | Empfänger<br>selektierter Marker |                      |
|---------|----------------------------------|----------------------|
|         | SA4(P22)<br>leuA124              | His(P22)<br>HisB22   |
| H5:LDK1 | $2,2 \times 10^{-7}$             | $4,0 \times 10^{-7}$ |
| H5:LDK2 | $4,8 \times 10^{-7}$             | $8,0 \times 10^{-7}$ |
| H5:LDK3 | $7,4 \times 10^{-7}$             | $6,0 \times 10^{-7}$ |
| H5:LDK4 | $3,4 \times 10^{-7}$             | $5,5 \times 10^{-7}$ |
| H5:LDK5 | $7,4 \times 10^{-7}$             | $6,2 \times 10^{-7}$ |
| H5:LDK6 | $5,5 \times 10^{-7}$             | $7,0 \times 10^{-7}$ |
| H5:LDK7 | $2,2 \times 10^{-7}$             | $6,8 \times 10^{-8}$ |
| H5:LT-2 | $5,5 \times 10^{-7}$             | $1,1 \times 10^{-6}$ |

T/P-Werte der auf den Stämmen LDK1-7 und LT-2 gezogenen H5-Phagen nach Transduktion in die Empfänger SA4(P22) und His(P22).

---

Tabelle 3.3.

| Phage    | I n d i k a t o r    |                   |                   | eop-Werte     |               |               |
|----------|----------------------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|
|          | LD10                 | LDK7              | LT-2              | LT-2/<br>LD10 | LT-2/<br>LDK7 | LDK7/<br>LD10 |
| A1a:LD10 | $3,3 \times 10^{10}$ | $1,3 \times 10^7$ | $4,6 \times 10^7$ | $10^{-3}$     | 1             | $10^{-3}$     |

Titer eines LD-gezogenen A1a-Phagen auf den Stämmen LD10, LDK7 und LT-2 und Bestimmung von eop-Werten.

#### 4. Aspekte zur Immunität des P22 gegen das SA-System

Colson und Colson (1971), Colson und v.Pel (1974) und v. Lieres (1974) beobachteten, daß der Phage P22 gegen die SA-Restriktion immun ist. Phagen, die auf LD-Stämmen gezogen worden waren, plattieren nahezu gleich gut auch auf dem Wildtyp-Stamm LT-2. Das heißt, die auf den modifikationsdefekten LD-Stämmen gezogenen, und somit an für dieses System spezifischen Basen unmodifizierten Phagen werden durch einen bakteriellen Wildtypstamm nicht restringiert. Für die Immunität des P22 gegen das SA-System können mehrere Hypothesen aufgestellt werden.

- a) Auf dem P22-Genom fehlt die für einen restriktiven Schnitt eines SA-Enzyms geforderte, spezielle Basensequenz.
- b) Der P22 codiert für ein Enzym, das ganz definierte Basen in einer spezifischen Basensequenz methyliert.

- c) Der P22 codiert für ein Enzym, das unspezifisch modifiziert.
- d) Der P22 codiert für ein entweder gleichzeitig injiziertes oder sofort nach Injektion synthetisiertes Enzym, das auf irgendeine Weise die Restriktionsenzyme des Wirtes inaktiviert.

Die beiden ersten Hypothesen würden Immunität gegen ein spezifisches Restriktionsenzym erklären. Wäre in der dritten Hypothese der Grund für die Immunität des P22 zu suchen, sollte der Phage unspezifisch gegen alle Restriktionssysteme resistent sein. Da der P22 jedoch z.B. durch das LT-System in *Salmonella typhimurium* restringiert wird (Colson et al., 1969), scheint diese Hypothese hier nicht zuzutreffen. Bei der vierten Hypothese wäre es denkbar, daß entweder Immunität gegen ein spezifisches Restriktionssystem vorliegt, oder aber gegen mehrere verschiedene. Um eine Entscheidung zwischen den genannten Erklärungsmöglichkeiten für die Immunität des P22 gegen das SA-System zu ermöglichen, wurden die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Versuche durchgeführt.

#### 4.1. Isolierung von P22-Mutanten, die sensitiv sind gegen das SA-System

Sowohl dann, wenn der P22 wegen mangelnder Schnittstellen immun wäre, als auch bei Vorhandensein eines Gens für ein Modifikationsenzym oder ein die Restriktionsenzyme des Wirts inaktivierendes Enzym, sollte es möglich sein, Mutanten des P22 zu finden, die auf SA-Restriktion ansprechen. Nimmt man an, es handelte sich um eine Sequenz von 5 spezifischen Basen, die auf dem P22-Genom Substrat für eine Restriktionsnuclease des SA-Systems wäre, so könnte es sein, daß beispielsweise zwei, drei oder vier dieser fünf Basen bereits

einmal oder auch mehrmals vorhanden sind. Durch Mutagenisieren des P22 könnten Basenumwandlungen zur Vervollständigung der Schnittstellensequenzen führen. Durch zwei- oder mehrfaches Mutagenisieren könnten möglicherweise mehrere Schnittstellen sukzessive entstehen. Kühnlein und Arber (1972) beschreiben Experimente, bei denen zwei unabhängige Mutationsschritte nötig sind, um bei den Phagen fd und f1 eine Immunität gegen Restriktion durch den Stamm E.coliB zu erreichen. Es war bekannt, daß diese Phagen zwei Schnittstellen für das Enzym aus E.coliB haben. Nach dem ersten Mutationsschritt treten intermediäre eop-Werte auf, nach dem zweiten Mutationsschritt sind die Phagen immun. Im Fall des P22 wäre zu erwarten, daß die Restriktionseffizienz mit wachsender Zahl von Schnittstellen zunähme.

Die Hypothese, daß die Immunität des P22 gegen das SA-System auf den Mangel der für dieses System spezifischen Schnittstellen zurückzuführen sein könnte, erscheint jedoch vorerst wegen der beachtlichen Größe des P22 unwahrscheinlich. In der Diskussion wird auf dieses Phänomen näher eingegangen werden.

Sollte der Phage P22 für ein SA-System spezifisches, methylierendes Enzym codieren, müßte dieses Gen auch durch Mutagenese zum Ausfall gebracht werden können, was eine Restriktion des P22 durch das SA-Restriktionsenzym zur Folge hätte. Eine weitere Mutagenese sollte insofern keinen Anstieg der Sensibilität nach sich ziehen, als bei Wegfall einer Modifikation sofort alle spezifischen Basensequenzen unmodifiziert sind und somit bereits nach diesem Mutationsschritt volle Restriktion auftreten sollte. Hier sind Einschränkungen dann zu machen, wenn man annehmen muß, daß man es mit einem sehr komplizierten Enzym zu tun hat, oder daß das entsprechende Gen möglicherweise als Tandem vorliegt.

Eine ähnliche Wirkung wäre beim Ausfall eines die Restriktionsenzyme des Wirtes inaktivierenden Enzyms zu erwarten, wie es in der Hypothese vier erwähnt wurde. Würde durch Mutagenese das Gen für ein solches Enzym geschädigt, könnte man sofort volle Restriktion des P22 erwarten.

Für die Suche nach P22-Mutanten, die durch das SA-System restringiert werden, wurde der Phage H5, eine Klarplaque-mutante des Phagen P22, wie in Meth. 2.25. beschrieben, mutagenisiert. Am Auftreten von Plaquemorphologiemutanten konnte die Wirksamkeit der Mutagenese grob abgeschätzt werden. Wie in Meth. 2.26. dargestellt, wurden die mutagenisierten Phagen auf LD10 plattiert und über Ausstechen einzelner Plaques und eine eop-Bestimmung auf den Grad ihrer Restriktion untersucht. Tab. 4.1. (S. 94) zeigt die Ergebnisse der Mutagenese und Isolierung der sogenannten mod-Mutanten.

Der Versuch ergab, daß bei der ersten Mutagenese von 72 geprüften Phagen 12 um den Faktor 10 empfindlicher gegen das Restriktionsenzym geworden waren. Mit 16,6% ist dieser Anteil ungefähr mit demjenigen von Klarplaquemutanten nach gleichartiger Mutagenese von Trübplaquephagen zu vergleichen. Im zweiten Ansatz wurde die Mutante mit dem höchsten Restriktionseffekt, der Stamm mod9, neu mutagenisiert. Unter den nunmehr 48 getesteten Phagen war nur einer, der eine noch höhere Empfindlichkeit gegen Restriktion zeigte. Eine weitere Mutagenese dieses einen Phagen, des Stammes mod43, brachte keine weitere Steigerung des Restriktionseffektes mehr. Erstaunlicherweise zeigten nur 7 von 60 Mutanten den gleichen Restriktionsfaktor wie die Ausgangsmutante mod43. Die restlichen 53 Phagen hatten nur noch einen eop-Wert von  $10^{-1}$ . Bereits hier ist zu beobachten, daß diese Mutanten instabil sind.

Weitere Plattierungen dieser Mutanten auf dem WT-Stamm LT-2 zeigten deutlich, daß nach einem Vermehrungszyklus in einem restriktiven Wirt die mod-Eigenschaft verloren geht.

Die folgenden Beobachtungen,

- a) häufiges Auftreten von mod-Mutanten mit dem Restriktionsfaktor  $10^{-1}$  im ersten Mutationsschritt,
- b) zweiter Mutationsschritt bis zum Restriktionsfaktor  $10^{-2}$  möglich,
- c) Verlust der mod-Eigenschaft bei Vermehrung in einem Wirt mit intaktem RM-System,

deuten darauf hin, daß die Mutation in einer Vervollständigung einer geforderten Basensequenz besteht, d.h. daß die Immunität des P22 auf mangelnde Schnittstellen zurückzuführen wäre. Und zwar lassen Punkt a) und b) Analogien zu den oben erwähnten Beobachtungen an den Phagen fd und f1 zu. Eine mögliche Interpretation der in Punkt c) gemachten Beobachtung wäre die Vorstellung, daß die Vervollständigung von Schnittstellen, die in der Veränderung einer oder mehrerer Basen an beliebiger Stelle des Phagengenoms besteht, Funktionen beeinträchtigt, die an der Phagenreifung beteiligt sind. Dies würde zu einem Selektionsvorteil für Rückmutanten bei einer erneuten Vermehrung führen. Wäre durch die Mutation jedoch ein Gen für eine phageneigene Modifikation oder ein die Restriktionsenzyme inaktivierendes Enzym getroffen, wären andere Phagenfunktionen wohl kaum beeinträchtigt und ein Wildtyp-Stamm hätte dementsprechend keine Wachstumsvorteile gegenüber den Mutanten. Zur weiteren Klärung und Abgrenzung der verschiedenen Hypothesen wurden Versuche gemacht, die in den nächsten Kapiteln beschrieben werden.

Tabelle 4.1.

|                                                        | Zahl der<br>getesteten<br>Plaques | davon Phagen mit dem<br>Restriktionsfaktor |           |           |           | Mutanten<br>in % |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|
|                                                        |                                   | $10^0$                                     | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ |                  |
| 1. Mutagenese<br>Phage H5                              | 72                                | 60                                         | 12        | 0         | 0         | 16,6             |
| 2. Mutagenese<br>Phage mod9<br>aus 1. Mu-<br>tagenese  | 48                                | 0                                          | 47        | 1         | 0         | 2,0              |
| 3. Mutagenese<br>Phage mod43<br>aus 2. Mu-<br>tagenese | 60                                | 0                                          | 53        | 7         | 0         | 0                |

Isolierung von mod-Mutanten des P22 mit abgestufter Sensitivität gegen das LD-Restriktionsenzym.

#### 4.2. Mischinfektionen zur Überprüfung P22-codierter Schutzfunktionen

##### 4.2.1. Mischinfektion mit P22 und dem Phagen A1a

Um zu klären, ob ein Phage für ein eigenes Modifikationsenzym codiert, das ihn befähigt, seine DNS der Restriktion zu entziehen, haben die Autoren Arber und Dussoix (1962) und Rosner (1973) eine simultane Infektion des Stammes E.coli mit dem restringierten Phagen  $\lambda$  und dem Phagen P1 mit der postulierten Modifikationsfunktion durchgeführt. Toussaint (1976) beschreibt ein ähnliches Experiment mit den Phagen Mu und  $\lambda$ .

Sowohl P1 als auch Mu modifizieren die DNS des  $\lambda$ . Es handelt sich dabei um eine mutierbare Funktion dieser Phagen.

Mit dem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob der restriktionsimmune Phage P22 den stark restringierten Phagen A1a bei gleichzeitiger Infektion einer  $r_m^-$ -Mutante, des Stammes LD10, so modifizieren kann, daß bei einer anschließenden eop-Messung der stark restringierte Phage einen eop-Wert von 1 erreicht, oder zumindest in deutlich geringerem Umfang restringiert wird. Die technische Durchführung der Mischinfektion ist in Meth. 2.27.1. beschrieben. Die mischinfizierten Phagen werden in unmodifiziertem Zustand eingesetzt.

In Vorversuchen zeigte sich, daß bei einer Superinfektion des Phagen P22 zu den Zeiten 0 bis 15 Minuten mit dem Trübsplaquephagen A1a lediglich dieser vermehrt wurde. Bei einer Nachinfektionsspanne von 20 Minuten konnte über Titerbestimmung mit Sicherheit nachgewiesen werden, daß sich beide Phagen vermehrt hatten. Arber und Dussoix (1962) beobachteten zu dieser Zeit eine nahezu vollständige Modifikation des Phagen  $\lambda$  durch P1. Auch der Phage Mu modifiziert  $\lambda$ -DNS ebenso gut wie seine eigene DNS, wenn  $\lambda$ -DNS 20 Minuten nach Induktion des Prophagen Mu injiziert wird. Die lange Nachinfektionszeit ist dennoch bedenklich, da bei P22 zu dieser Zeit die Phagenreifung bereits beendet sein kann. Der Versuch wurde dennoch durchgeführt und kann als zusätzliche Information zu den nachfolgenden Kapiteln herangezogen werden.

Die Tabelle 4.2.1. (S. 96) zeigt das Ergebnis des Versuchs. Der restriktionssensible Phage A1a hat auch nach gleichzeitigem Wachstum mit dem restriktionsresistenten Phagen P22 nur eine Überlebenschance von 1:1000 in einem restriktiven Wirt. Diese Wahrscheinlichkeit entspricht dem mehrfach beobachteten

eop-Wert des Phagen A1a (vgl. Erg. 1.4., 2.1. und 2.2.) und zeigt, mit dem erwähnten Vorbehalt, daß P22 die A1a-DNS nicht modifizieren kann.

---

Tabelle 4.2.1.

| Phage    | Indikator            |                      | eop-Werte          |
|----------|----------------------|----------------------|--------------------|
|          | LT-2                 | LD10                 |                    |
| H5:LD10  | $1,2 \times 10^{10}$ | $4,3 \times 10^{10}$ | 0,3                |
| A1a:LD10 | $7,0 \times 10^6$    | $1,7 \times 10^9$    | $4 \times 10^{-3}$ |

Titer der Phagen H5 und A1a nach gleichzeitiger Vermehrung im Stamm LD10 auf diesem Stamm und LT-2. Bestimmung der eop-Werte.

---

#### 4.2.2. Mischinfektion mit P22 und den Phagen A3, bzw. L

Im vorigen Versuch war der Phage A1a wegen seines hohen Restriktionsfaktors eingesetzt worden. Die Phagen A3 und L werden nicht so stark restringiert wie A1a, jedoch zeigte sich bei Vorversuchen, daß sich diese Phagen und P22 bei Mischinfektionen nur sehr wenig in ihrer gegenseitigen Vermehrung behindern. Auch Bezdek und Amati (1968) berichten, daß sich die Phagen L und P22 gut nebeneinander in einer Zelle vermehren. Der Vorteil bei den Mischinfektionen mit den Phagen A3 und P22, bzw. L und P22 ist dabei, daß jeweils mit beiden Phagen zur genau gleichen Zeit infiziert werden kann. Bedenken, wie sie bei der Mischinfektion mit P22 und A1a entstehen, können somit ausgeschlossen werden. Das wiegt den Nachteil geringerer Restriktionsfaktoren auf.

Um herauszufinden, ob der Phage P22 einer Restriktion durch das SA-System durch eine Modifikation seiner eigenen und somit auch fremder DNS entgeht, wurde, wie auch bei der Mischinfektion P22-A1a, die  $r^{-}m^{-}$ -Mutante LD10 mit verschiedenen Phagen, bzw. Phagengemischen infiziert. Um eine Modifikation durch P22 beobachten zu können, müssen alle Phagen unmodifiziert sein. In vier Parallelansätzen wurden zwei Mischinfektionen mit den Phagen A3:LD10 + H5:LD10 und L:LD10 + H5:LD10, und zwei Einzelinfektionen, nämlich mit den Phagen A3:LD10 und L:LD10 als Kontrolle durchgeführt. Alle Kulturen wurden mit KCN synchronisiert und die Modifikation der Phagen A3, bzw. L nach 20, 30 und 50 Minuten überprüft (vgl. Meth. 2.27.2.).

Im Falle der Mischinfektion gelangt die DNS zweier Phagen in unmodifiziertem Zustand in eine Zelle, die weder modifiziert noch restringiert. Codiert der Phage P22 für ein Gen, dessen Produkt seine DNS an den für das SA-System spezifischen Stellen modifiziert, so sollte unter den beschriebenen Bedingungen die DNS der mitinfizierten Phagen A3, bzw. L ebenfalls an den restriktionsempfindlichen DNS-Sequenzen modifiziert werden.

Die auf die beschriebene Weise in dem Stamm LD10 vermehrten Phagen A3 und L wurden einem eop-Vergleich unterzogen (vgl. Meth. 2.5.), wobei die Abgrenzung dieser Phagen vom Phagen P22, wie in Meth. 2.27.2. erwähnt, über die unterschiedliche Plaquemorphologie möglich war. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind der Tab. 4.2.2. (S. 99) zu entnehmen. Bei einer Mischinfektion des Stammes LD10 mit P22 und dem Phagen A3 oder L behalten diese den für sie typischen eop-Wert von  $10^{-1}$ , bzw.  $10^{-2}$ . Diese Werte entsprechen auch den Kontrollwerten der jeweiligen Einzelinfektionen zu allen drei Ent-

nahmezeiten. Die aus Mischlysaten erhaltenen restringierten Phagen sind nicht durch P22 modifiziert worden.

Krüger et al. (1977) diskutieren die Hypothese, daß ein Phage durch einen von ihnen "aktiver Schutz" genannten Mechanismus immun sein könnte. Dabei wären vom Phagen codierte Enzyme für eine Inaktivierung der bakteriellen Restriktionsenzyme verantwortlich. Der Mechanismus einer derartigen Inaktivierung ist jedoch noch unbekannt (vgl. Diskussion).

Um diese Hypothese auch im vorliegenden Fall zu überprüfen, wurden wieder Mischinfektionen durchgeführt. Es wurde jedoch diesmal nicht die  $r^{-m^{-}}$ -Mutante LD10, sondern der Wildtypstamm LT-2 mit den im vorigen Experiment beschriebenen Phagen und Phagengemischen infiziert. Die unmodifizierten Phagen infizieren somit Zellen, die sowohl restringieren, als auch modifizieren. Die Ergebnisse dieser Mischinfektionen waren durch unkontrollierbare, gegenseitige Störungen der Phagen nur schwer auswertbar. Es hatte jedoch den Anschein, als ob P22 nicht in der Lage wäre, restriktionssensible Phagen vor Degradierung zu schützen.

Tabelle 4.2.2.

| Phagen               | Entnahmezeiten nach Infektion in Minuten | Indikator         |                      | eop-Wert  |
|----------------------|------------------------------------------|-------------------|----------------------|-----------|
|                      |                                          | LT-2              | LD10                 |           |
| A3:LD10              | 20                                       | $1,2 \times 10^8$ | $5,3 \times 10^8$    | 0,5       |
|                      | 30                                       | $1,5 \times 10^9$ | $1,0 \times 10^{10}$ | $10^{-1}$ |
|                      | 50                                       | $3,0 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^{10}$ | $10^{-1}$ |
| A3:LD10 +<br>H5:LD10 | 20                                       | $3,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$    | $10^{-1}$ |
|                      | 30                                       | $3,0 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$    | $10^{-1}$ |
|                      | 50                                       | $2,5 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^9$    | $10^{-1}$ |
| L:LD10               | 20                                       | $7,6 \times 10^6$ | $5,7 \times 10^8$    | $10^{-2}$ |
|                      | 30                                       | $1,4 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^9$    | $10^{-2}$ |
|                      | 50                                       | $3,0 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^{10}$ | $10^{-2}$ |
| L:LD10 +<br>H5:LD10  | 20                                       | $1,0 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^7$    | $10^{-2}$ |
|                      | 30                                       | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^9$    | $10^{-2}$ |
|                      | 50                                       | $4,0 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^9$    | $10^{-2}$ |

Titer und eop-Werte der Phagen A3:LD10 und L:LD10 nach Wachstum im Stamm LD10 mit und ohne gleichzeitiger Infektion des Phagen H5:LD10 zu verschiedenen Zeiten nach Infektion.

#### 4.3. Kreuzung des Phagen L mit verschiedenen amber-Mutanten des Phagen P22

Den Kreuzungsexperimenten dieses Kapitels lag die Überlegung zugrunde, daß Rekombinanten zwischen dem restriktionsresistenten Phagen P22 und dem ca. 100-fach stärker restringierten Phagen L möglicherweise "neue" Restriktionseffekte zeigen, die Rückschlüsse auf die Ursache der Resistenz des P22 gegen die SA-Restriktion erlauben.

Bezdek und Amati beschrieben 1968 Kreuzungen zwischen den Phagen P22 und L, bei denen Rekombinanten hinsichtlich der Immunität isoliert werden konnten. Nachdem die beiden Autoren bereits 1967 zeigen konnten, daß sich die Phagen P22 und L nahezu ausschließlich durch ihre Immunität unterscheiden, war es ihnen nun möglich, Rekombinanten der Elternphagen P22 und L zu finden, die ein von diesen abweichendes Immunitätsverhalten zeigten. Die Ergebnisse bestätigten zugleich Befunde von Zinder (1958), die für zwei funktionell und lokal voneinander zu unterscheidende Immunitätsregionen bei P22 sprachen. Bezdek und Amati (1968) wiesen mit ihren Kreuzungen nach, daß auch der Phage L zwei unterschiedliche Immunitätsregionen besitzt. Neben der sog. C-Region mit den Genen zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Lysogenie, sowie der Repression der Replikation superinfizierender Phagen gleicher Immunität, tragen die Phagen L und P22 noch eine sog. I-Region, die eine Art Kontrollfunktion über die C-Region ausübt (Botstein et al., 1975; Levine et al., 1975).

Um das Immunitätsmuster von Rekombinanten untersuchen zu können, kann wegen der Gene *sieA* und *sieB* des P22 (vgl. 1.1.) dieser Phage nicht in Wildtypform verwendet werden. Durch die *sie*-Ausschlußsysteme ist eine P22-lysogene Zelle dann scheinbar immun. Lysogenisiert man die Bakterien jedoch mit

der P22-Mutante sie1 (vgl. Mat. 1.2.1.), so wird die Vermehrung eines superinfizierenden Phagen nur durch den Repressor unterdrückt. Das nachfolgende Schema (Bezdek und Amati, 1968) zeigt das unterschiedliche Immunverhalten von Rekombinanten.

lysogenisierte Bakterien

| Phagen                | LT-2(P22) | LT-2(L) | LT-2(RI) | LT-2(RII) |
|-----------------------|-----------|---------|----------|-----------|
| Eltern                |           |         |          |           |
| P22 = $P22_C^{P22_I}$ | -         | +       | +        | +         |
| L = $L_C^{L_I}$       | +         | -       | -        | +         |
| Rekombinanten         |           |         |          |           |
| RI = $L_C^{P22_I}$    | +         | +       | -        | +         |
| RII = $P22_C^{L_I}$   | -         | +       | +        | -         |

Dabei bedeutet "+", daß der plattierte Phage auf dem lysogenisierten Bakterium etwa halb bis doppelt so gut wächst wie auf einem prophagenfreien LT-2; "-" zeigt dagegen einen eop-Wert von ca.  $10^{-6}$  an.

Es ist auffällig, daß die Immunitätsmuster der Rekombinanten nicht symmetrisch sind. Die Autoren schließen daraus, daß der I-Repressor des P22 die Synthese des I-Antirepressors des Phagen L verhindert, nicht jedoch umgekehrt das I-Produkt des Phagen L an der I-Region des Phagen P22 angreifen kann.

Wie aus dem Schema ersichtlich, ist die Rekombinante vom Typ RI mit dem Immunitätsgenotyp  $L_C^{P22_I}$  sehr einfach zu isolieren, da sie, im Gegensatz zu den beiden Elternphagen und dem

Rekombinantentyp RII, sowohl auf P22-lysogenen als auch L-lysogenen Zellen wächst.

Mit diesen Rekombinanten läßt sich ein Austausch der Genome von P22 und L zwischen den I- und C-Regionen beobachten. Um nun einigermaßen gut definierte, nach Möglichkeit verschiedenen lange Genomabschnitte beobachten zu können, wurde der Phage L nicht mit dem P22-Wildtyp gekreuzt, sondern mit Phagenmutanten, die in verschiedenen Genen amber-Mutationen trugen.

Aufgrund der Eigenschaft, trotz einer an sich letalen Mutation unter bestimmten Umständen lebensfähig zu sein, werden amber-Mutanten, ebenso wie temperatursensitive Mutanten, "konditional letal" genannt. Plattiert man die in diesem Experiment verwendeten amber-Mutanten auf dem Suppressor-Stamm Su70 (vgl. Mat. 1.1.1.), so bilden sie dort Plaques.

Bei allen P22-amber-Mutanten sind bestimmte Gene des Phagen P22 mutiert, auf dem Phagen L liegen diese Gene jedoch in Wildtypform vor. Durch Plattieren von Rekombinanten der beiden Phagen auf dem Stamm LT-2 läßt sich erkennen, ob die betrachtete amber-Mutation des P22 durch den Wildtypmarker des Phagen L ersetzt worden ist. Ist dies der Fall, wächst die Rekombinante auf LT-2.

Wächst diese Rekombinante auch noch auf den Stämmen Su70(L) und Su70(sie) (vgl. Mat. 1.1.1.), dann liegt eine Rekombinante vom Typ RI, gekoppelt mit dem jeweils über die amber-Mutation beobachteten Gen vor.

Bedingung für die Austauschbarkeit der Gene zwischen den Phagen P22 und L ist deren funktionelle und lokale Analogie, die von den Autoren Kahmann und Prell (1971) nachgewiesen wurde.

Im vorliegenden Experiment wurden Phagen-Stämme verwendet, die in den folgenden Genen eine amber-Mutation trugen (vgl. Mat. 1.2.1.):

- am 9 : Defekt im Gen 9, dieses codiert für ein base-plate-Protein.
- am 80<sub>C2</sub> : Defekt im Gen 12. Proteine dieses Gens sind an der DNS-Synthese beteiligt.
- am 100 : Defekt im Gen 18, das, wie Gen 12, für Proteine der DNS-Synthese codiert.
- am 23 : Defekt im Gen 23. Dieses Gen codiert für einen Aktivator, der die Ablesung der späten Gene ermöglicht.
- am 19 : Defekt im Gen 19, dem Gen für das Lysozym.
- am 3 : Defekt im Gen 3. Hier wird möglicherweise das für das Schneiden von DNS-Konkatemeren verantwortliche Enzym gebildet. Es ist somit an der Kopfmorphogenese beteiligt.
- am 2/13: Defekt in den Genen 2 und 13. Das Gen 2 ist, wie Gen 3, für einen frühen Schritt der DNS-Reifung verantwortlich. Gen 13 ist an der Lyse der Zelle beteiligt.
- am 8/13: Defekt in den Genen 8 und 13. Das Gen-8-Produkt stellt ein Protein des Phagenkopfes dar, das nur in Vorstadien, nicht jedoch im reifen Phagen gefunden werden kann.

Die Abb. 4.3.1. (S. 108) zeigt, wie die Gene auf dem Phagen-genom in Relation zur C- und I-Region angeordnet sind. Die unterbrochene Linie stellt ein Beispiel für eine denkbare Rekombinante vom Typ RI dar, wie sie im oben angegebenen Schema charakterisiert ist. Dieser neu entstandene Phage hat die I-Region von P22 und den Bereich von der C-Region bis mindestens zum Gen 23 vom Phagen L. Diese drei Punkte

sind durch die Art der Selektion festgelegt. Es kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, wie lang der Bereich dieses Phagen jenseits des Gens 23 ist. Als Extremfälle wäre einerseits denkbar, daß ein zweites crossover unmittelbar hinter dem Gen 23 stattgefunden hat, so daß zwischen dem Gen 23 und der I-Region alles von P22 stammt; andererseits könnte das zweite crossover unmittelbar vor der I-Region erfolgt sein. Das hätte zur Folge, daß der erwähnte Bereich durch das L-Genom vertreten wäre.

Mit der Verwendung der beschriebenen amber-Mutanten ist es jedoch möglich, wenigstens den DNS-Bereich zwischen der Immunitätsregion I und dem jeweils beobachteten Gen relativ sicher zu fixieren. Ein Genaustausch durch Doppelcrossover ist jedoch nicht auszuschalten und muß bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden. Je größer der Abstand zwischen den beiden beobachteten Markern ist, desto häufiger können sich Doppel- oder geradzahlige Mehrfachcrossover ereignen. Eine bessere Kontrolle über diese Ereignisse erhält man, wenn die amber-Doppelmutanten am 2/13 und 8/13 eingesetzt werden, da dann ein weiterer Punkt auf dem Genom festliegt.

Mit einschließlic der Mutante am 8/13 kann somit über die Hälfte einer RI-am 8/13-Rekombinante durch den Phagen L repräsentiert sein. Es sollte untersucht werden, wie empfindlich Rekombinanten mit unterschiedlich langen Teilstücken des Phagen L gegen SA-Restriktion sind.

Nimmt man an, P22 hätte keine Schnittstellen, so wäre zu erwarten, daß die Restriktionseffekte umso geringer sind, je größer der Anteil des P22 an der Rekombinante ist. Je größer dagegen der Anteil des Phagen L an der Rekombinanten wäre, desto eher sollte ein L-ähnlicher Restriktionseffekt beob-

achtet werden können. Lagen alle Schnittstellen des L dicht nebeneinander in einem Bereich, der durch die beschriebene Selektion nicht erfaßt wird, sollten überwiegend P22-ähnliche Restriktionswerte für die Rekombinanten zu beobachten sein.

Geht man jedoch davon aus, daß P22 Schnittstellen hat, die durch ein P22-codiertes Enzym vor Restriktion geschützt würden, so sollte unter den untersuchten Rekombinanten folgendes zu beobachten sein:

- 1) P22-Restriktionseffekte, wenn die Rekombinanten das Gen für den Schutz erhalten haben.
- 2) Stärkere Restriktionseffekte, als die des Phagen L, wenn die Rekombinante von beiden Elternphagen Erkennungssequenzen erhalten hat und die Summe größer ist, als deren Anzahl beim Phagen L.
- 3) Ausschließlich L-Restriktionseffekte, wenn P22 Erkennungssequenzen hat, die an den gleichen Positionen liegen, wie beim Phagen L.

In Vorversuchen wurden zunächst ca. 50 Rekombinanten auf ihre Empfindlichkeit gegen SA-Restriktion untersucht, die aus einer Kreuzung zwischen dem Phagen L und der P22-Mutante sie<sup>1</sup> hervorgegangen waren. Dabei wurde ausschließlich auf den Rekombinantentyp RI selektioniert. Die auf diese Weise isolierten Mutanten können ganz verschieden lange Bereiche der beiden Elterngenome haben. Es zeigte sich, daß etwa 70 % dieser Phagen mit einem eop-Wert um  $10^{-1}$  eine intermediäre Empfindlichkeit gegen Restriktion zeigten. Ca. 25 % der untersuchten Rekombinanten zeigten den für den Phagen L typischen eop-Wert von ca.  $10^{-2}$  und nur zwei Rekombinationsprodukte wurden nur wenig stärker als P22 angegriffen. Die für

P22 zu beobachtenden Werte wurden nicht erhalten, ebenso wenig Rekombinanten, die deutlich stärker restringiert würden als L.

Die technische Durchführung der Kreuzungen zwischen dem Phagen L und den erwähnten amber-Mutanten, die Isolierung der Rekombinanten und die Bestimmung von deren Restriktionseffekten ist in Meth. 2.28. beschrieben. Aus jeder Kreuzung wurden bis zu 36 Plaques auf Rekombination untersucht.

In Abb. 4.3.2. (S. 109) sind die eop-Werte der untersuchten Rekombinanten graphisch dargestellt. Am häufigsten treten Werte um  $5 \times 10^{-2}$  auf. Der ungefähre Restriktionseffekt des Phagen L ist bei sechs Rekombinanten zu beobachten, nirgends dagegen der Wert des Elternphagen P22.

Aus der Kreuzung L/am 9 wurden 36 Phagen untersucht. Nur einer erwies sich als die gesuchte RI-am 9-Rekombinante. Sie legt durch ihren L-ähnlichen Restriktionswert Schnittpunkte zwischen dem Gen 9 und der C- oder I-Region beim Phagen L nahe. Für die Interpretation der eop-Werte für den Rekombinantentyp RI-am 12 muß dann aber postuliert werden, daß der Rekombinationsprozeß zwischen I und C jenseits vom Gen 9 stattgefunden haben muß. Da das Gen 9 der I-Region sehr nahe benachbart ist, wäre das nicht unwahrscheinlich. Zwischen C und Gen 12 würde dann vermutlich keine Schnittstelle liegen. Die eop-Werte für den Rekombinantentyp RI-am 18 ist sehr heterogen. Möglicherweise liegt zwischen den Genen 12 und 18 mehr als eine Schnittstelle. Die etwas schwächer als L restringierten Rekombinantentypen RI-am 23, RI-am 19, RI-am 3 und RI-am 8/13 sagen lediglich aus, daß diese Rekombinanten möglicherweise eine Schnittstelle weniger haben als L. Der starke Restriktionseffekt zweier Rekombinanten vom Typ RI-am 2/13 könnte mit einer zwischen den Genen 3 und 2 liegenden Schnittstelle zu erklären sein.

Wie die eop-Werte aller untersuchten Rekombinanten zeigen, ist eine Kartierung der Schnittstellen auf dem Phagen L nur sehr pauschal möglich, vermutlich wegen der eingangs in diesem Kapitel erwähnten Probleme.

Die bei gleichzeitiger Existenz von Schnittstellen und eines für ein schützendes Protein codierendes Gen bei P22 erwarteten Rekombinantentypen (vgl. S. 105) waren nicht zu beobachten. Keine der untersuchten Rekombinanten zeigte einen P22-Restriktionseffekt, keine wurde signifikant stärker restringiert als L, ebenso traf es nicht zu, daß ausschließlich L-Restriktionseffekte auftraten. Diese Ergebnisse stärken die bereits aus den vorigen Experimenten abgeleitete Vorstellung, daß dem Phagen P22 die Erkennungssequenzen für das SA-System fehlen.

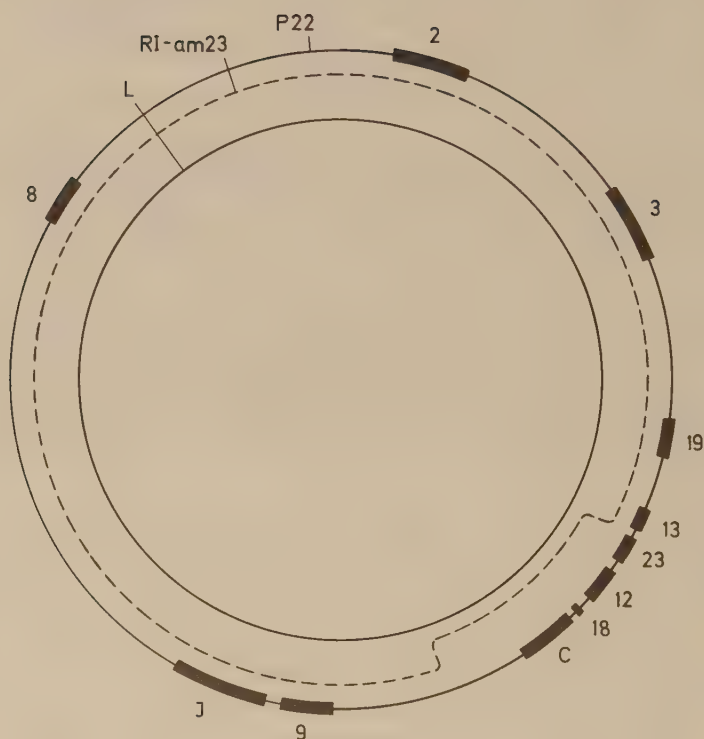


Abb. 4.3.1.

Positionen der Immunitätsregionen I und C sowie verschiedener anderer Gene auf dem P22-Genom (äußerer Kreis). Darstellung einer möglichen Rekombinante vom Typ RI-am23 (gestrichelte Linie) aus einer Kreuzung zwischen der P22-Mutante am23 und dem Phagen L (innerer Kreis).

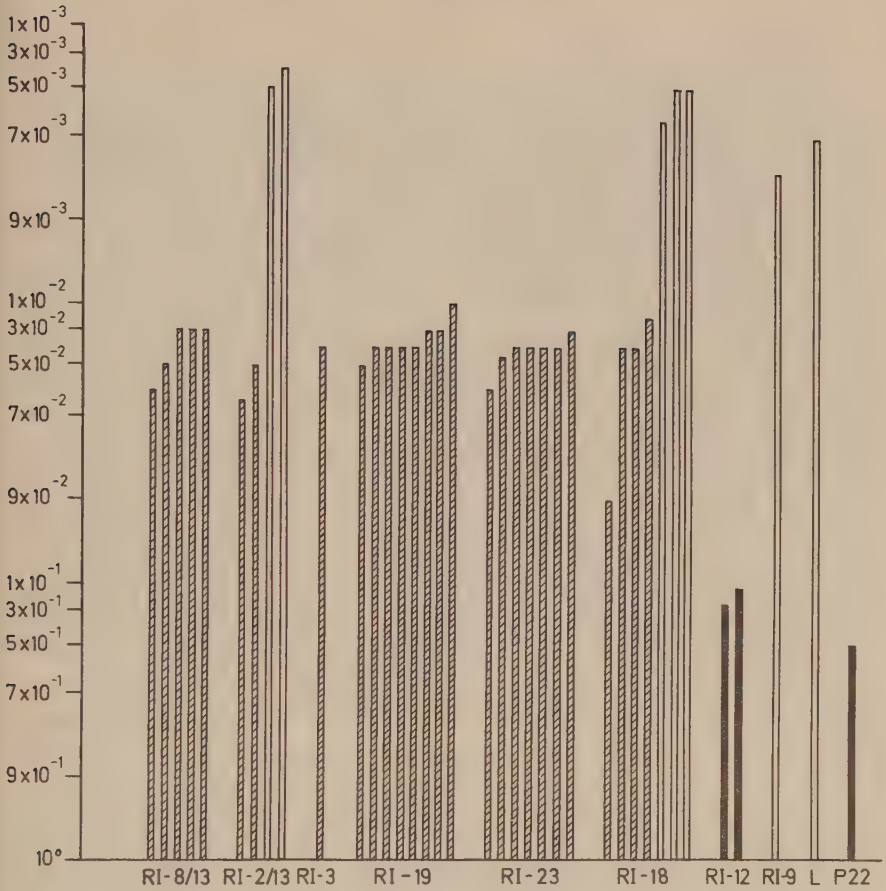


Abb. 4.3.2.

Restriktionsfaktoren von Rekombinanten zwischen verschiedenen amber-Mutanten des P22 und dem Phagen L (z.B. RI-9), sowie der Phagen P22 und L. Ordinate mit logarithmischer Skala.

## D. DISKUSSION

Aufgabe dieser Arbeit war es, Transduktionsspendermutanten von *Salmonella typhimurium*, die von v. Lieres (1974) isoliert worden waren und den Phänotyp eines schlechten Spenders bei Transduktionen hatten (= low donor capacity = LD), genotypisch zu charakterisieren. Nach Experimenten von v. Lieres stand als Erklärung für die um ca. den Faktor 40 reduzierten T/P-Werte solcher Lysate, die auf den LD-Mutanten gezogen worden waren folgende Hypothese zur Diskussion: Die Mutation besteht in einem Ausfall eines Restriktions-Modifikations-Systems in LD-Zellen. Die Folge davon ist unmodifizierte DNS in t.p., die in Empfängerzellen mit intaktem RM-System restringiert wird. Bei dieser Hypothese war man jedoch mit dem Problem konfrontiert, daß infektiöse Partikel des Phagen P22 trotz Wachstums in LD-Zellen keine signifikante Restriktion in WT-Zellen zeigten. Sollte sich im Verlauf der Arbeit die RM-Hypothese als zutreffend erweisen, so war dann das Phänomen der Unempfindlichkeit des Phagen P22 gegen diese spezifische Restriktion zu untersuchen.

Vorerst wurde schrittweise auf genetischem Weg versucht, die RM-Hypothese zu untermauern. Dazu wurde in der von v. Lieres vorgegebenen Richtung weitergearbeitet. Um zu untersuchen, ob das Defizit an Transduktanten möglicherweise auf eine DNS-degradierende Funktion des in den Transduktionsempfängerzellen integrierten Prophagen zurückzuführen ist, hatte sie die alle Arten von superinfizierende Phagen-DNS durch Abbau ausschließenden sieA- und sieB-Funktionen (vgl. Erg. 1.1.) durch eine entsprechende Phagenmutante auszuschalten versucht. Ein nächster Schritt bestand darin, den Prophagen aus den Empfängerzellen ganz zu eliminieren, wobei jedoch ausnahmsweise mit dem temperenten Phagen H1 transduziert worden

war. Trotz dieser Maßnahmen wurden LD-gezogene t.p. um den Faktor  $10^2$  reduziert. Um eine mögliche Störung durch den Phagen H1 auszuschalten, wurde in dieser Arbeit der letzte Versuch von v. Lieres mit der Klarplaque-Mutante H5 unter drastisch veränderten Versuchsbedingungen zum Zwecke des Schutzes einmal entstandener rekombinativer Transduktanten wiederholt. Das Ergebnis dieser Transduktion bestätigte diejenigen von v. Lieres und belegte eindeutig, daß der aus labortechnischen Gründen bei Transduktionen in Empfängern integrierte Prophage nicht die Ursache für den LD-Effekt ist. Die signifikante Reduktion der Transduktantenzahl ließ sich somit auf eine bakterielle Funktion einengen.

Ein die Hypothese der Wirkung eines RM-Systems stützendes Experiment von v. Lieres war die Transduktion zwischen einem LD-Spender und einem LD-Empfänger. Bei einer Transduktion dieser Art sollte keine Restriktion zu beobachten sein, da LD-Zellen, laut Hypothese, nicht restringieren dürfen. Das Ergebnis war in der Tendenz wie erwartet, nicht jedoch in den absoluten Werten. Bei der schrittweisen Verfeinerung dieses Versuchs während dieser Arbeit zeigte sich, daß WT-Transduktionshäufigkeiten mit LD-Lysaten immer dann zu erhalten waren, wenn die in WT- und LD-Transduktionen zu vergleichenden Auxotrophiemarker identisch waren und zusätzlich die Transduktion zwischen isogenen LD-Mutanten durchgeführt wurde. Dies deshalb, da bei der Isolierung der LD-Mutanten phänotypische Unterschiede zwischen diesen beobachtet worden waren, und zwar sowohl bezüglich der Stärke des LD-Effekts als auch deren Fähigkeit, den Phagen P22 zu vermehren. Das läßt vermuten, daß unterschiedliche LD-Genotypen isoliert worden waren.

Die phänotypischen Unterschiede zwischen verschiedenen LD-Mutanten warfen die Frage auf, ob es wahrscheinlich ist, daß diese sich tatsächlich durch verschiedene Restriktionssysteme unterscheiden, oder ob andere Faktoren, wie z.B. Adsorption oder DNS-Replikation, die Uneinheitlichkeit dieser Mutanten verursachen. Alle LD-Stämme wurden immerhin über den Marker HisB22 isoliert. Die DNS der diese Marker tragenden t.p. müßte dann für verschiedene Restriktionsenzyme Substrat sein. Zur Beantwortung dieser Frage lassen sich die Ergebnisse des Kapitels 3 heranziehen. Es hatte sich dort gezeigt, daß ein neu isolierter LD-Stamm die für den Marker HisB22 übliche Reduktion der Transduktionshäufigkeit aufwies, wenn mit einem auf diesem Stamm gezogenes Phagenlysate transduziert worden war. Gleichzeitig war jedoch bei einem eop-Vergleich eines auf dem Stamm LD10 und dem neu isolierten LD-Stamm gezogenen Phagen A1a zu beobachten gewesen, daß dieser Phage offensichtlich in dem neuen LD-Stamm nicht an den für den Stamm LD10 spezifischen Stellen unmodifiziert geblieben war. Es zeigt sich also hier eine gewisse Berechtigung für die Vorstellung, daß mehr als ein Enzym seine spezifischen Basensequenzen im Bereich des Gens HisB22 findet. Es ist somit durchaus möglich, daß einige der zahlreichen isolierten LD-Stämme unterschiedliche Restriktionsgenotypen haben.

Für eine zusätzliche Sicherung der RM-Hypothese dienten im weiteren Verlauf der Arbeit vor allem die Experimente der Cotransduktion, der Überprüfung verschiedener Marker des bakteriellen Chromosoms auf Restriktion und der Untersuchung verschiedener Salmonellaphagen auf ihren jeweiligen Grad der Restriktion.

Wie in Erg. 1.3. ausführlich dargelegt, kann über Cotransduktionshäufigkeiten verschiedener Marker auf eine Degradierung der diese Marker tragenden Fragmente geschlossen werden.

Postuliert man einen auf die Wirkung von Restriktionsenzymen zurückgehenden Abbau der DNS von t.p. in den Empfängerzellen, so sind bei LD-Lysaten reduzierte Cotransduktionshäufigkeiten zu erwarten, je nachdem, wo Erkennungssequenzen auf den beobachteten Fragmenten sitzen (vgl. Erg. 1.3.). In allen untersuchten Cotransduktionen wurden für LD-Lysate reduzierte Werte erhalten. Das bedeutet, daß in den beobachteten Fragmenten ara-leu und trp-cys-pyr alle Marker in gewissem Umfang durch Restriktion beeinträchtigt sind. Das Ergebnis spricht zwar eindeutig in der Tendenz für die Wirkung einer Restriktion, es ist jedoch nicht ganz zufriedenstellend. Es war nicht zu erwarten gewesen, daß bei allen fünf geprüften Marker die Rekombinationshäufigkeit durch Restriktionsschnitte reduziert sein würde. Wie das später durchgeführte Experiment des Markervergleichs (vgl. Erg. 1.5.) zeigt, ist das wohl auch tatsächlich nicht der Fall. Zumindest scheinen in unmittelbarer Nähe der Marker trpA52 und cysB12 keine Restriktionsschnitte zu liegen. Die Marker leuA124, araB9 und pyrF146 zeigen dagegen Restriktionseffekte um den Faktor 10.

Wie bereits in Erg. 1.3. erwähnt, sind im vorliegenden Fall die Werte der Cotransduktion mehr qualitativ zu betrachten. Die hohen Transduktantenzahlen auf den Stempelmutterplatten machen quantitative Aussagen wegen mangelnder Reproduzierbarkeit der absoluten Werte problematisch. Nach den in Erg. 1.3. ausgeführten theoretischen Überlegungen ist jedoch für die allgemein zu beobachtenden Reduktionen der Cotransduktionshäufigkeiten von t.p., die aus LD-Zellen stammen, kein anderer Grund denkbar als eine Größenverringerung dieser Fragmente durch eine Funktion der WT-Zelle.

In Vorwegnahme der Diskussion über die Identität der SA- und LD-Systeme soll an dieser Stelle eine kurze Betrachtung

über die mögliche Wirkungsweise des hier vorliegenden Restriktionsenzym des SA-Systems angestellt werden, da die stark schwankenden Werte der Cotransduktionshäufigkeiten eventuell ein Ausdruck der Arbeitsweise dieses Enzyms sein könnten.

Es war bekannt, daß das Restriktionsenzym des K-Systems in *E.coli* ein Typ I-Enzym ist (vgl. Einl.). Colson und v. Pel (1974) kartierten die SA- und SB-Systeme in *S.typhimurium* an vergleichbarer Stelle wie das K-System in *E.coli* und wiesen die Komplementierbarkeit der K- und SB-Systeme nach. Dies läßt den Schluß zu, daß das SB-Restriktionsenzym vom Typ I ist. Es wäre nun gut denkbar, daß das SA-System durch eine Duplikation und anschließende Erkennungsspezifitätsänderung durch Mutation entstanden sein könnte. Das SA-Enzym wäre dann auch dem Typ I zuzuordnen.

Handelte es sich tatsächlich um ein Typ I-Enzym, so bestünde ein zeitlicher und örtlicher Unterschied zwischen der Erkennung der spezifischen Basensequenz und dem Schneiden der DNS. Ort und Zeitpunkt des Schneidens variieren, je nach den Bedingungen des Experimentes. Nicht nur die schlecht reproduzierbaren Werte der Cotransduktion, sondern auch immer wieder zu beobachtende Schwankungen von T/P-Werten wären mit der Annahme eines Typ I-Enzyms erklärbar.

Colson und v. Pel (1974) fanden jedoch gewisse Unterschiede im Verhalten der SA- und SB-Systeme gegenüber hohen Temperaturen. Das SB-System ist temperatursensibel sowohl bezüglich der Restriktion als auch der Modifikation. Beim SA-System ist dagegen nur die Restriktion durch Temperaturänderungen zu beeinflussen. Dieser Befund spricht für unterschiedliche Enzymtypen.

Aufschlußreiche Resultate wurden aus der Bestimmung von T/P-Werten verschiedener, rund um das bakterielle Chromosom verteilten Marker aus LD-Lysaten erhalten. Bei Wirkung eines RM-Systems war, wie in Erg. 1.5. anhand des SV40-Genoms dargelegt, nicht zu erwarten gewesen, daß unterschiedliche Bereiche der bakteriellen DNS in gleichem Umfang restringiert würden.

Diese Voraussage wurde bestätigt. Weiter war zu beobachten, daß um das Chromosom kein "Restriktionsgradient" existiert. Marker, die gar keiner Restriktion unterliegen, solche mit maximalem Restriktionsfaktor von  $10^2$  und dazwischen liegende Werte sind zufallsmäßig über das Chromosom verteilt (vgl. Abb. 1.5., S. 68).

Benzinger und Kleber (1971) berichten von einem Modifikations-System in *S.typhimurium*, vermutlich dem LT-System (vgl. Einl.), das durch Methylierung von ca. 40 - 50 Basen die bakterielle DNS modifiziert.

Die markerspezifischen T/P-Wert-Reduktionen lassen im vorliegenden Fall mit großer Sicherheit drei Schnittstellen für eine LD-spezifische Restriktion erkennen und zwar im Bereich der Gene *HisB22*, *trpB2* und *ilvA99*. In zehn weiteren DNS-Ab-schnitten des Chromosoms können wegen der ebenfalls noch signifikant vom WT-T/P-Wert abweichenden Restriktionsfaktoren um ca. den Faktor 10-20 Schnittstellen vermutet werden. Man kann weiter annehmen, daß auf den nichtuntersuchten Chromosomenabschnitten weitere Schnittstellen liegen.

Durch das Auffinden von Teilabschnitten des bakteriellen Chromosoms, die von Restriktion unbehelligt bleiben, wird die spätere Diskussion über die Restriktionsresistenz des P22 erleichtert. Transduzierende und Phagen-DNS haben exakt

die gleiche Länge, da für beide DNS-Arten Köpfe mit identischer Kapazität zur Verfügung stehen (Zinder, 1955). Die Größe des Phagen muß somit nicht unbedingt gegen eine Hypothese mangelnder Schnittstellen auf dem Phagen sprechen.

Die Untersuchungen verschiedener Salmonellaphagen auf ihren Grad der Restriktion (vgl. Erg. 1.4.) haben gezeigt, daß es weitere Phagen, nämlich die Stämme 9NA, FO und SP6, gibt, die gegen LD-Restriktion immun sind.

Daneben zeigte sich, daß andere Phagen, wie z.B. A1a oder KB in gewissermaßen "klassischer" Weise nach Wachstum auf dem Stamm LD10 im WT-Stamm LT-2 restringiert werden. Jeder untersuchte Phage scheint durch das im Wildtyp wirksame Restriktionssystem bei fehlender Modifikation in reproduzierbarem, spezifischem Maß restringiert zu werden. Die stark angegriffenen Phagen A1a und KB waren zusätzlich auf dem Stamm LT-2 gezogen und anschließend die eop-Werte auf LT-2 und LD10 bestimmt worden. Es zeigte sich keine Restriktion. Diese Ergebnisse sind ohne Einschränkung mit den zahlreichen bekannten Messungen der Restriktion von Phagen verschiedener Bakterienstämme zu vergleichen (vgl. Einl.).

Interessant war die Beobachtung, daß Phagen, die aufgrund unterschiedlicher Kriterien als nahe verwandt mit P22 zu gelten hatten, wie z.B. der nahezu identische Phage L und der zu etwa ein Drittel aus P22 bestehende Phage Px (vgl. Erg. 1.4., S. 56), keineswegs gleiches Restriktionsverhalten zeigten. Diese offensichtlich fehlende Korrelation zwischen Verwandtschaft und Empfindlichkeit gegen Restriktion ist umso erstaunlicher, als bekanntlich mit Hilfe von Restriktionsenzymen Verwandtschaftsgrade bestimmter DNS-Moleküle nachgewiesen werden. DNS-Moleküle, die von einem bestimm-

ten Restriktionsenzym in Fragmente gleicher Länge zerlegt werden, sieht man als sehr nahe verwandt an, da die Ähnlichkeit gewissermaßen bis in die kleinste DNS-Einheit, die Basen, geht. Wie nun aber vor allem der Unterschied der eop-Werte zwischen den Phagen P22 und L, die, wie erwähnt, fraglos sehr nahe miteinander verwandt sind (Kahmann und Prell, 1971), zeigt, ist der Schluß, daß nahe verwandte DNS-Moleküle auch in vergleichbare Restriktionsfragmente zerlegt werden, nicht zulässig. Nahe Verwandtschaft bei unterschiedlicher Empfindlichkeit gegen Restriktion wäre möglicherweise so erklärbar, daß die Identität von Proteinen dadurch, daß der genetische Code degeneriert ist, erhalten bleibt. Es kann eine einzige Base in Erkennungssequenzen so verändert sein, daß zwar die RM-Spezifität verloren gegangen ist, das veränderte Triplet jedoch immer noch für dieselbe Aminosäure codiert. Das vergleichbare Protein, und somit die Funktion, bleibt unverändert.

Eine zusätzliche Information zum Problem der Resistenz gewisser DNS-Moleküle gegen Restriktion wurde durch die Ergebnisse der F-Duktion erhalten. Das hier transferierte Operon für Laktoseabbau zeigte sich gegen LD-Restriktion resistent. Ein Selbstschutz des Episoms erscheint sehr unwahrscheinlich. Zwischen den beiden verbleibenden Hypothesen einer möglicherweise restriktionsunempfindlichen, einsträngigen Übertragungsform bei F-Duktionen, bzw. daß das aus E.coli stammende lac-Operon keine Schnittstelle für das vorliegende Enzym hat, kann nicht entschieden werden. Angesichts der Befunde über schnittstellenfreie Abschnitte des S.typhimurium-Chromosoms erscheint die zweite Hypothese jedoch durchaus realistisch.

Ein die Wirkung einer Restriktion auf die DNS von t.p. abschließend beweisendes Experiment wurde mit der Abbaumessung radioaktiv markierter unmodifizierter Phagen-DNS durchgeführt.

Vorerst war versucht worden, den Abbau radioaktiv markierter DNS von t.p. zu messen. Wie aus Erg. 1.5. (S. 65) ersichtlich, muß innerhalb eines Lysats jedoch mit einem Gemisch an t.p. gerechnet werden, die einen Restriktionsfaktor von  $10^0$  -  $10^{-2}$  aufweisen. Das bedeutet, daß keine deutlichen Abbaukurven zu erwarten sind. Auch die quantitativen Einbußen an radioaktivem Material durch die gleichzeitige Anwesenheit unmarkierter infektiöser Partikel im selben Lysat, machten sich störend bemerkbar.

Da die Abbaumessungen eines stark restringierten Phagen für den Nachweis einer Restriktion ebenso relevant, jedoch weder durch Materialverlust noch durch unterschiedliche Restriktionsgrade des markierten Materials belastet war, wurde das Experiment mit dem Phagen A1a durchgeführt, der sich wegen seines hohen Restriktionsfaktors optimal eignete. Der restriktive Abbau dieses Phagen in WT-Zellen nach Wachstum im Mutantenstamm LD1.1 ließ sich zweifelsfrei nachweisen. Die Probleme der unspezifischen Degradierung modifizierter DNS auch in nichtrestriktiven Zellen wurden in Erg. 1.7. besprochen.

Die Summe aller Ergebnisse der bisher diskutierten Experimente beweist die für diese Arbeit aufgestellte Hypothese. Die Mutation im Spenderbakterium stört die modifizierende Funktion dieser Zellen. Da sie lebensfähig sind, muß zwangsläufig auch deren Fähigkeit zur Restriktion verlorengegangen sein. Dabei kann noch nicht gesagt werden, ob der Genotyp  $r^{-m}$  vorliegt, oder ob die Erkennungsfunktion der spezifischen Basensequenz verändert ist. Auch in diesem Fall ist

der Phänotyp  $r^-m^-$  zu beobachten. Aus der Tatsache jedoch, daß für eine Änderung der Erkennungsspezifität nur ein Gen mutiert sein müßte, für den Ausfall der Gene für Restriktion und Modifikation dagegen zwei Mutationen nötig sind, lassen sich gewisse Rückschlüsse ziehen. Die Mutationshäufigkeit für Doppelmutanten des Genotyps  $r^-m^-$  stellt das Produkt aus den Mutationshäufigkeiten für jedes einzelne Gen dar und ist somit sehr gering. Da phänotypische  $r^-m^-$ -Mutanten als LD-Mutanten verhältnismäßig leicht zu finden sind, kann vermutet werden, daß die LD-Mutation in einem Ausfall des Gens für die spezifische Erkennung besteht.

Es stellte sich nun die Frage nach der Identität des LD-Systems.

Schon bei der Überprüfung verschiedener Phagen auf Restriktion fiel auf, daß der Phage L nach Wachstum auf dem Stamm LD10 einen eop-Wert von  $10^{-2}$  zeigte. Dieser Wert ist identisch mit demjenigen, der auftritt, wenn dieser Phage auf einem Stamm vermehrt wird, der in den Genen für Modifikation und Restriktion des SA-Systems in *S.typhimurium* (Colson und v. Pel, 1974) defekt ist. Andere Beobachtungen dieser Autoren zeigten ebenfalls Parallelen zu Befunden dieser Arbeit. Es waren dies die Resistenz des Phagen P22 gegen SA-Restriktion und Resistenz des F-duzierten lac-Operons aus *E.coli*. Es erschien somit vernünftig, Untersuchungen in dieser Richtung fortzusetzen.

Mit der Bestimmung von eop-Werten verschiedener Phagen, die entweder auf dem modifikationsdefekten Stamm LD10 oder auf dem für das SA-System modifikations- und restriktionsdefekten Stamm 4423 (Colson und v. Pel, 1974) gewachsen waren, auf eben diesen Stämmen und dem WT-Stamm LT-2, wurde durch die absolut vergleichbaren Restriktionswerte die Identität

der beiden Systeme sehr wahrscheinlich. Dies deshalb, weil in den Stämmen LD10 und 4423 jeweils systemspezifische Basensequenzen unmodifiziert bleiben. Nur das korrespondierende Restriktionsenzym kann diese unmodifizierte Sequenz erkennen und restriktiv wirken. Enzyme des gleichen Organismus mit gleicher Erkennungsspezifität dürften jedoch identisch sein. Einschränkung muß hier erwähnt werden, daß die Schnittstellenspezifität von Restriktionsenzymen nicht unbedingt den Schluß auf identische Enzyme zuläßt. Es gibt eine Reihe von sicherlich nicht identischen Enzymen, die dennoch gleiche Schnittstellen erkennen, z.B. die Enzyme HaeIII und BsuR. Für beide ist die Basensequenz 3'-C-C-G-G-5' Substrat.

Die identische Cotransduktionshäufigkeit der Gene  $r_{SA}^{mSA}$  und der LD10-spezifischen Gene mit dem Marker  $pyrB$  untermauert jedoch die besprochenen, für die Identität der SA- und LD10-Systeme sprechenden Experimente, da gleiche Cotransduktionshäufigkeiten zweier Marker gleichen Abstand dieser Marker voneinander bedeuten. Die Mutation im Stamm LD10 hat deshalb mit großer Sicherheit dieselbe Lokalisation auf dem *S.typhimurium*-Chromosom, wie die Gene des SA-Systems.

Bei *E.coli* konnte über Rekombination und Komplementation neben den Cistrons  $hsr$  und  $hsm$  mit methylierender und restringierender Funktion noch das Cistron  $hss$  kartiert werden, dessen Produkt für die Erkennung der spezifischen Schnittstellen verantwortlich ist (Glover und Colson, 1969; Arber und Linn, 1969).

Der Phänotyp  $r^{-}m^{-}$  kann, wie bereits erwähnt, somit sowohl auf den Genotyp  $hsr^{-}hsm^{-}$ , als auch  $hss^{-}$  zurückgeführt werden. Nur Mutanten mit dem Phänotyp  $m^{+}r^{-}$  haben mit Sicherheit

ein nichtmutiertes hss-Cistron. Es wurde bereits erläutert, wie aufgrund von Mutationshäufigkeiten zwischen den in Frage stehenden Mutantentypen abgewägt werden kann. Um genau zwischen dem Genotyp hsr<sup>-</sup>hsm<sup>-</sup> oder hss<sup>-</sup> im vorliegenden Fall entscheiden zu können, müßte eine Feinkartierung über Rekombination und Komplementation durchgeführt werden, da die Kartierungsmethode der Cotransduktion lediglich einen Schluß auf die Lage aller drei Cistrons im Verhältnis zu bestimmten Auxotrophiemarkern zuläßt.

Für die Untersuchungen zur Resistenz des P22 gegen das Enzym des SA-Systems konnte nach verschiedenen Beobachtungen an P22 und einem Vergleich dieser Befunde mit den nachfolgend aufgezählten Hypothesen ein bestimmter Weg eingeschlagen werden. Die Hypothesen sind:

- 1) Der Phage hat für das beobachtete Restriktionsenzym keine Schnittstelle.
- 2) Der Phage codiert für ein Enzym, das durch Modifikation der DNS vor Restriktion schützt, und zwar
  - 2.1.) an mehr oder weniger unspezifischen Basen
  - 2.2.) an ganz bestimmten Basen einer spezifischen Basensequenz.
- 3) Der Phage codiert für ein Protein, das
  - 3.1.) direkt am Restriktionsenzym angreift und eine Endonuclease-Wirkung so verhindert,
  - 3.2.) geschnittene DNS wieder repariert,
  - 3.3.) das Zellmilieu durch Membranveränderungen so ändert, daß Restriktionsenzyme funktionsunfähig werden.

Hypothese 1 ist immer dann eindeutig bestätigt, wenn die Phagen-DNS unter optimalen Bedingungen in vitro durch das gereinigte Enzym nicht geschnitten wird. Die Hypothesen 2.1., 3.2. und 3.3. können zutreffen, wenn durch Mutation des Phagen die Resistenz gegen verschiedene Enzyme verloren geht, da diese Schutzmechanismen pauschal gegen Enzyme verschiedener Systeme gerichtet sind.

Resistenz gegen ein spezifisches Enzym kann durch die Hypothesen 1, 2.2. und 3.1. erklärt werden.

Die Hypothese 1 repräsentiert eine cis-Funktion. Die Resistenzursache ist unveränderlich an die DNS fixiert. Zu beobachten wäre in diesem Fall Resistenz der Phagen-DNS in vivo, aber auch in vitro gegen das in Frage stehende Restriktionsenzym. Trautner et al. (1974) beschreiben ein derartiges Verhalten bei einigen *B. subtilis*-Phagen. Sie waren in beiden Fällen resistent gegen das Enzym BsuR. Günthert et al. (1975) konnten über biochemische Messungen methylierter Basen nachweisen, daß der resistente Phage SPO1 von *B. subtilis* nicht methyliert wird. Neben der Möglichkeit einer anderen Art der Modifikation, wie z.B. der Glucosylierung, diskutieren die Autoren das Fehlen der relativ einfachen Erkennungssequenz dieses Enzyms: 3'-C-C-G-G-5'. Trotz eines GC-Gehalts von 45 % der SPO1-DNS und eines Molekulargewichts von  $100 \times 10^6$  Daltons erscheint diese Interpretation glaubwürdig, da die unmodifizierte DNS des Phagen SPO1 auch in vitro gegen das Enzym BsuR immun ist.

Bei den Hypothesen 2 und 3 müßten Trans-Funktionen zu beobachten sein, da in allen Fällen diffussible Genprodukte für Restriktionsresistenz verantwortlich wären. Dabei konnten in Anbetracht der Beobachtungen an P22 alle Hypothesen, die Resistenz gegen mehrere Enzyme bedingen, herausgefiltert werden, da P22 von EcoRI angegriffen wird, ebenso von den

Enzymen des LT-Systems von *S.typhimurium* und des SP-Systems von *S.potsdam* (Bullas und Colson, 1975a). Auch die Enzyme des durch Rekombination des SB-Systems von *S.typhimurium* und des SP-Systems entstandenen Systems SQ greifen P22 an (Bullas et al., 1976).

Anders liegt der Fall z.B. beim Phagen Mu. Toussaint (1976) hatte beobachtet, daß der *E.coli*-Phage Mu gegen verschiedene Restriktionsenzyme nur sehr schwach sensitiv war. Sie konnte Mutanten isolieren, die gegen alle Restriktionen sensitiv waren, sog. mom-Mutanten. Weiter war nachweisbar, daß Mu die DNS eines coinfizierten, restriktionssensiblen  $\lambda$  modifiziert. Damit war eine "all-round"-Modifikation nachgewiesen. Die Evidenz für eine Methylierung zeigte die Autorin, indem sie nachwies, daß nicht die mom-Funktion alleine für die Phagenmodifikation verantwortlich ist, sondern auch noch die dam- und dcm-Funktionen des Wirtes beteiligt sind (Toussaint, 1977). Mutanten mit Defekten im dam- oder dcm-Gen sind nicht mehr fähig, Adenine oder Cytosine zu methylieren. Die Restriktionsresistenz des Mu beruht somit auf einer allgemein DNS-methylierenden, phagencodierten Funktion mit Abhängigkeit vom Wirt.

Die Autoren Krüger et al. (1977) haben die Immunität der Phagen T3 und T7 gegen K- und B-Restriktion von *E.coli* in vivo untersucht. Durch Mischinfektionen konnten die Autoren demonstrieren, daß die Resistenz dieser Phagen nicht auf eine Modifikation zurückzuführen ist, sondern auf eine der in Hypothese 3 aufgeführten Möglichkeiten schließen läßt. Die Mutation in den von den Autoren isolierten, sensiblen Mutanten, sog. ocr-Mutanten (= overcome classical restriction) liegt bei oder in einem Gen, dessen Produkt nach Infektion der Zelle in hoher Zahl produziert wird (was von einem vor Restriktion schützenden Protein gefordert werden muß) und

das in irgendeiner Weise die Permeabilität der Zellmembran beeinflusst. Deshalb wird folgende Hypothese diskutiert: Durch die veränderte Zellmembranpermeabilität ändert sich das Zellmilieu in der Weise, daß die  $Mg^{++}$ -bedürftigen Restriktionsenzyme inaktiviert werden, andere, weniger stark  $Mg^{++}$ -abhängige Enzyme dagegen noch nicht gestört sind. Dieser Dissoziation wären dann aber alle Restriktionsenzyme einer Zelle unterworfen. Resistenz gegen ein einzelnes Enzym kann deshalb mit diesem Modell nicht erklärt werden.

1973 entdeckten die Autoren Zabeau et al., daß  $\lambda$  über ein Gen zur "restriction alleviation" = ral verfügt. Durch die Wirkung dieses Genprodukts scheint sich  $\lambda$  in gewissem Umfang gegen die Restriktion durch die K- und B-Systeme von E.coli zu schützen. Die Autoren diskutieren eine direkte Interaktion des ral-Produkts mit den Restriktionsenzymen oder eine Reparatur der geschnittenen DNS. Die Autoren stützen ihre Hypothese auf Beobachtungen von Interaktionen zwischen  $\lambda$ -Genprodukten und Exonucleasen des Stammes E.coli, die an Rekombinationsvorgängen beteiligt sind.

Ein phagencodierter Reparaturmechanismus geschnittener Restriktionsfragmente wäre jedoch nur dann systemspezifisch vorstellbar, wenn nach dem Restriktionsschnitt jede unspezifische Nucleasewirkung unterbleibt, da nur dann die Erkennungsregion für eine spezifische Reparatur wiederzufinden wäre. Da diese Voraussetzung wohl normalerweise nicht gegeben ist, kann man davon ausgehen, daß eventuell vorhandene Reparaturmechanismen die von verschiedenen Restriktionen betroffenen Fragmente gleichermaßen reparieren würden.

Sehr spezifisch müßte man sich dagegen eine direkte Interaktion eines die Restriktion blockierenden Proteins vorstellen.

len, wenn dieses direkt am Restriktionsenzym angreift, und zwar wegen dessen sicher hochspezifischer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur.

Als Arbeitshypothesen für die Untersuchungen an P22 blieben somit

- 1.) mangelnde Schnittstellen
- 2.) spezifische Modifikation
- 3.) spezifische Interaktion mit dem SA-Restriktionsenzym.

Die Schnittstellenhypothese schien wegen der Größe des P22 problematisch. Die Beobachtung an anderen Phagen ähnlicher Größe, die offensichtlich ebenfalls durch mangelnde Schnittstellen resistent sind und die Existenz P22-langer, schnittstellenfreier DNS-Abschnitte bakterieller Chromosomen schwächten jedoch die Bedenken ab.

Die Resultate der Experimente der Mischinfektion eines nicht-restriktiven Wirtes mit den unmodifizierten Phagen A3, bzw. L und dem resistenten P22 (vgl. Erg. 4.2.) haben eindeutig gezeigt, daß die eop-Werte der sensiblen Phagen auch nach Wachstum mit P22 den für ihren unmodifizierten Zustand charakteristischen Wert hatten. Daraus wurde geschlossen, daß P22 seine Restriktion nicht durch Modifikation seiner, und somit auch mitinfizierter Fremd-DNS verhindert.

Um zwischen den beiden verbleibenden Hypothesen abwägen zu können, wurden Ergebnisse der folgenden Versuche herangezogen: Die Isolierung von SA-restriktionssensiblen P22-Mutanten, die Mischinfektion eines restriktiven Wirtes mit A3 bzw. L und P22 und die Kreuzungen von P22 mit dem Phagen L.

Die Summe aller Beobachtungen erhärtet die Vorstellung, daß P22 keine Schnittstellen für eine SA-spezifische Restriktion aufweist. Es sind dies:

- 1.) Die stufenweise Mutierbarkeit des P22 zu einer Sensibilität, die derjenigen des Phagen L sehr ähnlich ist und mit einer schrittweisen Vervollständigung von Schnittstellen zu erklären wäre.
- 2.) Die Instabilität der mod-Mutanten nach Wachstum in WT-Zellen, die darauf hindeutet, daß durch die Entstehung von Erkennungssequenzen in verschiedenen Genen selektive Nachteile für die Mutanten entstanden sind, weshalb sie von Rückmutanten verdrängt werden.
- 3.) Das Verhalten der unmodifizierten, sensiblen Phagen A3 und L bei Mischinfektion mit P22 in restriktiven Zellen.
- 4.) Die Tatsache, daß unter allen untersuchten Rekombinanten der Phagen P22 und L keine gefunden werden konnte, die stärker als L restringiert worden wäre, keine, die den Restriktionseffekt des P22 gezeigt hätte, jedoch zahlreiche Rekombinanten, die intermediäre Restriktionswerte hatten.

Diese Beobachtungen sprechen jedoch nicht vorbehaltlos für die Schnittstellenhypothese. Es wäre nämlich denkbar, daß ein postuliertes schützendes Protein entweder durch Tandemgene codiert wird und somit ein in seiner Sensibilität abgestufter Phänotyp einer quantitativen Abstufung der Enzymproduktion bei schrittweisem Mutieren vervielfachter Gene entspräche, oder die Affinität eines sehr komplexen Moleküls zu seinem Reaktionspartner stufenweise veränderbar ist.

Gegen die Interpretation der Ergebnisse der Kreuzungsversuche kann man einwenden, daß genau der Abschnitt des P22 in keiner der Rekombinanten erfaßt ist, auf dem das in Frage stehende Gen liegt. Es lassen sich auch Anordnungen von spezifischen Basensequenzen auf dem P22-Genom in Relation zu deren Position im L-Genom vorstellen, die nur in seltenen Fällen Rekombinanten mit höheren Schnittstellenzahlen nach sich ziehen würden als sie der Phage L besitzt.

Der beobachtete niedrige Titer der sensiblen Phagen im Mischlysat bei Infektion eines restriktiven Wirtes könnte auf Störeffekte des P22 zurückzuführen sein.

Es scheint jedoch trotz der erwähnten Einwände viel dafür zu sprechen, daß P22 für das Restriktionsenzym des SA-Systems keine Schnittstellen besitzt. Der endgültige Nachweis könnte erst durch eine Inkubation der P22-DNS mit dem isolierten Enzym in vitro erbracht werden.

Mit den Untersuchungen über die Ursache der Resistenz des Phagen P22 gegen die Restriktion seiner DNS durch Enzyme der Wirtszelle schließt sich der Kreis dieser Arbeit, die mit Betrachtungen über die Abwehrmechanismen von Bakterien gegen Phagen-DNS begonnen hatte. Die im Laufe der Evolution entwickelten Fähigkeiten von Bakterien, Fremd-DNS, insbesondere Phagen-DNS durch Restriktion an ihrer Replikation in der Zelle zu hindern (vgl. Einl.), können von Phagen mit ganz verschiedenen Abwehrmechanismen beantwortet werden, die eine Abschwächung oder völlige Verhinderung des tödlichen Angriffs zur Folge haben.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

1. LD-Spendermutanten wurden daraufhin untersucht, ob der Phänotyp dieser Mutanten durch eine Mutation in den Genen für Modifikation und Restriktion zu erklären ist.
  - 1.1. Durch eine Transduktion mit alysogenem Empfänger konnte sowohl eine Degradierung der t.p. durch phagenco-dierte sie-Systeme, als auch ein Abbau der t.p. durch möglicherweise vorhandene phageneigene Restriktionsenzyme ausgeschlossen werden.
  - 1.2. Bei einer Transduktion zwischen einem LD-Spender und einem LD-Empfänger wurden Wildtyp T/P-Werte erhalten. Dieses Ergebnis zeigte, daß LD-Stämme in einem Gen für Restriktion defekt sind.
  - 1.3. Mit Hilfe der Methode der Cotransduktion, d.h. über die Messung von Cotransduktionshäufigkeiten zweier nahe benachbarter Marker, konnte nachgewiesen werden, daß t.p., die in einem LD-Spender gebildet worden waren, in einem restriktiven Empfänger degradiert werden. Sowohl bei t.p. mit den Markern  $leu^+ara^+$  als auch solchen mit den Markern  $trp^+cys^+$  und  $pyr^+$ , war eine signifikante Reduzierung der Cotransduktionshäufigkeit zu beobachten.
  - 1.4. Die Messung von eop-Werten 11 verschiedener Phagen, die auf dem Spender LD10 gezogen wurden, zeigten ein Restriktionsmuster von  $eop = 1$  bis  $eop = 10^{-5}$ . Diese Ergebnisse ließen den sicheren Schluß auf die Wirkung eines Restriktionsenzym an unmodifizierten Phagen zu.

- 1.5. Zwanzig Marker des Salmonella-Chromosoms wurden auf ihren Grad der Restriktion überprüft. Es konnten solche gefunden werden, die stärker restringiert werden als der Marker hisB22; die meisten Marker zeigten eine mittlere Restriktion um den Faktor 10 - 20; einige Marker waren von der Restriktion nicht betroffen.
  - 1.6. Ein aus einem LD-Spender in einen Wildtypempfänger über F-Duktion transferiertes Gen für Laktoseabbau wurde durch die vorliegende Restriktion nicht angegriffen.
  - 1.7. Nach einer Infektion eines restriktiven Wirtes mit einem auf einem LD-Stamm gezogenen,  $^3\text{H}$ -markierten Phagen A1a und anschließender Reextrahierung der Phagen-DNS sowie Messung des Molekulargewichts der restringierten DNS durch Zentrifugation in Sucrosegradienten, konnte der Abbau der LD-gezogenen Phagen nachgewiesen werden. In Kontrollen war lediglich eine schwache unspezifische Nucleasewirkung zu beobachten.
2. Das im ersten Teil der Arbeit nachgewiesene Restriktionssystem wurde mit dem SA-System von Salmonella typhimurium verglichen und als dieses identifiziert.
- 2.1. Zehn der in Kapitel 1.4. beschriebenen Phagen wurden auf dem Stamm LD10 gezogen und anschließend auf dem für die SA-Restriktion defekten Stamm 4423, und den Stämmen LD10 und LT-2 plattiert und die jeweiligen eop-Werte bestimmt und verglichen. Die Restriktionsmuster auf den Indikatoren 4423 und LD10 waren identisch.

- 2.2. Zur Erhärtung dieses Befundes wurden 5 Phagen auf einer für die SA-Restriktion defekten Mutante gezogen und die eop-Werte auf diesem Stamm und LD10 bestimmt. Auch hier war das Restriktionsmuster auf beiden Indikatoren identisch.
- 2.3. Das LD10-Gen wurde über Cotransduktion kartiert. Es zeigte die gleiche Cotransduktionshäufigkeit von 2,2 % mit dem Marker pyrB, die auch für das SA-System zu beobachten war. Die beiden Systeme kartieren somit an identischen Stellen im Chromosom von *S.typhimurium*.
3. Bei Anwendung der für die Isolierung von LD-Mutanten benutzten Methode des Sprühens für die Marker proAB und leuA, waren für den ersten Marker keine LD-Mutanten zu finden. Beim Test der über den Marker leuA isolierten potentiellen Transduktionsmutanten, konnte bei einer Transduktion des Markers hisB22 ein Stamm gefunden werden, der in einem anderen als dem SA-System defekt zu sein scheint.
4. Um den Grund für die Immunität des P22 gegen das SA-System zu finden, wurden folgende Experimente durchgeführt.
- 4.1. Es wurden Mutanten des P22 isoliert, die gegen das SA-System sensitiv sind. Nach einer ersten Mutagenese traten Mutanten mit der eop =  $10^{-1}$  mit einer Häufigkeit von 16,6 % auf. Nach einem zweiten Mutationsschritt wurde eine Restriktion um den Faktor  $10^{-2}$  mit einer Häufigkeit von 2 % erreicht. Eine dritte Mutagenese konnte den Restriktionseffekt nicht mehr steigern. Die sogenannten mod-Mutanten waren instabil. Nach einem Vermehrungszyklus in einem Wildtypstamm ging die mod-Eigenschaft wieder verloren.

4.2. Die Ergebnisse von Mischinfektionen mit den durch das LD-System restringierten Phagen A1a, A3 bzw. L und dem gegen Restriktion resistenten Phagen P22 im Stamm LD10 zeigten, daß P22 kein Gen für ein modifizierendes Enzym trägt.

Liefen die Mischinfektionen im Stamm LT-2 ab, so sprechen die Resultate dafür, daß P22 wahrscheinlich auch keinen andersartigen Schutz auf mitinfizierte Phagen ausübt.

4.3. Aus Kreuzungen zwischen dem restringierten Phagen L mit verschiedenen amber-Mutanten des restriktionsimmunen Phagen P22 gingen Rekombinanten mit unterschiedlich langen Bereichen der beiden Elternphagen hervor. Die Restriktionseffekte dieser Mutanten zeigten entweder die Werte des Phagen L oder verschiedene Zwischenstufen. Es konnte weder der eop-Wert des Elternphagen P22, noch eine deutlich stärkere Restriktion als beim Phagen L gefunden werden. Die Ergebnisse der Kapitel 4.1.-4.3. machten wahrscheinlich, daß der Phage P22 keine Schnittstellen für das SA-System trägt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, E.S.; A. Felix (1952)  
Variation in Vi-phage II of Salmonella typhi.  
Nature, 170, 492-494
- Arber, W. (1965)  
Host - controlled modification of bacteriophage  $\lambda$  .  
Ann. Rev. Microbiol. 19, 365-378
- Arber, W.; D. Dussoix (1962)  
Host specificity of DNA produced by Escherichia coli  
I. Host controlled modification of bacteriophage  $\lambda$  .  
J. Mol. Biol. 5, 18-36
- Arber, W.; D. Dussoix (1965)  
Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. V:  
The role of methionine in the production of host specificity.  
J. Mol. Biol. 11, 247-256
- Arber, W.; S. Hattman; D. Dussoix (1963)  
On the host - controlled modification of bacteriophage  $\lambda$  .  
Virology 21, 30-35
- Arber, W.; S. Linn (1969)  
DNA modification and restriction.  
Ann. Rev. of Biochem. 38, 467-500
- Arber, W.; M.L. Morse (1965)  
Host specificity of DNA produced by E.coli.  
VI. Effects on bacterial conjugation.  
Genetics 51, 137-148

Benzinger, R.; J. Kleber (1971)

Transfection of E.coli and Salmonella typhimurium spheroplasts:  
Host - controlled restriction of infective bacteriophage P22 DNA.  
J. Virology 8, 197-202

Bertani, G.; J.J. Weigle (1953)

Host controlled variation in bacterial viruses.  
J. Bacteriol. 65, 113-121

Bezdek, M.; P. Amati (1967)

Properties of P22 and a related Salmonella typhimurium  
phage L. I. General features and host specificity.  
Virology 31, 272-278

Bezdek, M.; P. Amati (1968)

Evidence for two immunity regulator systems in temperate  
bacteriophages P22 and L.  
Virology 36, 701-703

Bigger, C.H.; K. Murray; N.E. Murray (1973)

Recognition sequence of a restriction enzyme.  
Nature New Biol. 244, 7-10

Blakesly, R.W.; R.D. Wells (1975)

Single-stranded DNA from  $\phi$  X174 and M13 is cleaved by certain  
restriction endonucleases.  
Nature 257, 421-422

Boro, H.; J.E. Brenchley (1971)

A new generalized transducing phage for Salmonella  
typhimurium LT-2  
Virology 45, 835-836

- Botstein, D. (1968)  
Synthesis and maturation of phage P22 DNA.  
I. Identification of intermediates.  
J. Mol. Biol. 34, 621-641
- Botstein, D.; K.K. Lew; V. Jarvik; C.A. Swanson jr. (1975)  
Role of antirepressor in the bibartite control of repression  
and immunity by bacteriophage P22  
J. Mol. Biol. 91, 439-462
- Boyd, J.S.K. (1950)  
The symbiotic bacteriophages of *Salmonella typhimurium*.  
The Journal of Pathology and Bacteriology 62, 501-517
- Boyd, J.S.K.; D.E. Bidwell (1957)  
The type A phages of *Salmonella typhimurium* by standardized  
cross-immunity test: Identification  
J. Gen. Microbiol. 16, 217-227
- Boyer, H. (1964)  
Genetic control of restriction and modification in  
*Escherichia coli*.  
J. Bacteriol. 88, 1652-1660
- Boyer, H.W.; L.T. Chow; A. Dugalczyk; J. Hedgpeth;  
H.M. Goodman (1973)  
DNA substrate site for the EcoRII restriction endonuclease  
and modification methylase.  
Nature New Biol. 244, 40-43
- Boyer, H.W.; D. Roulland-Dussoix (1969)  
A complementation analysis of the restriction and  
modification of DNA in *Escherichia coli*.  
J. Mol. Biol. 41, 459-472

Brack, C.; H. Eberle; T.A. Bickle; R. Yuan (1976)  
Mapping of recognition sites for the restriction endonuclease  
from *E.coli* K12 on bacteriophage PM2-DNA

J. Mol. Biol. 108, 583-593

Bullas, L.R.; C. Colson (1975)

DNA restriction and modification systems in *Salmonella*

III. SP, a *Salmonella potsdam* System allelic to the SB  
System in *Salmonella typhimurium*.

Molec. Gen. Genet. 139, 177-188

Bullas, L.R.; C. Colson; A. v. Pel (1976)

DNA restriction and modification systems in *Salmonella*

IV. SQ, a new system Derived of recombination between the  
SB system of *Salmonella typhimurium* and the SP system of  
*Salmonella potsdam*

J. Gen. Microbiol. 95, 166-172

Chelala, C.A.; P. Margolin (1976)

Evidence that HT mutants strains of bacteriophage P22 retain  
an altered form of substrate specificity in the formation of  
transducing particles in *Salmonella typhimurium*.

Gen. Res. 27, 315-322

Colson, A.M.; C. Colson; A. v. Pel (1969)

Host controlled restriction mutants of *Salmonella typhimurium*

J. Gen. Microbiol. 58, 57-64

Colson, C.; A.M. Colson; A. v. Pel (1970)

Chromosomal location of Host Specificity in *Salmonella*  
*typhimurium*.

J. Gen. Microbiol. 60, 265-271

Colson, C.; A.M. Colson (1971)

A new *Salmonella typhimurium* DNA host specificity

J. Gen. Microbiol. 69, 345-351

Colson, C.; S.W. Glover; N. Symonds; K.A. Staley (1965)  
The location of the genes for hostcontrolled modification  
and restriction in *Escherichia coli* K12.

Genetics 52, 1043-1050

Colson, C.; A. v. Pel (1974)

DNA restriction and modification systems in *Salmonella*.

I. SA and SB, two *Salmonella typhimurium* systems determined  
by genes with a chromosomal location comparable to that of  
the *Escherichia* *hsd* genes.

Mol. Gen. Genet. 129, 325-337

Dawson, G.W.P. (1963)

The interpretation of data from transduction experiments.

Genet. Res. 4, 416-426

Dussoix, D.; W. Arber (1962)

Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*

II. Control over acceptance of DNA from infecting phage

J. Mol. Biol. 5, 37-49

Ebel-Tsipis, J.; D. Botstein (1971)

Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of  
*Salmonella typhimurium*. I. Exclusion of generalized  
transducing particles.

Virology 45, 629-637

Ehrlich, S.D.; V. Sagaramella; J. Lederberg (1976)

Transfection of restrictionless *Escherichia coli* by bacterio-  
phage T7 DNA: Effect of in vitro erosion of DNA by  $\lambda$   
exonuclease.

J. Mol. Biol. 105, 603-609

Felix, A.; B. Callow (1943)

The British Journal of Psychology. Medical section. ii. 127

Fukasawa, T. (1964)

The course of infection with abnormal bacteriophage T4 containing non-glucosylated DNA on Escherichia coli strains. J. Mol. Biol. 9, 525-536

Glover, S.W.; C. Colson (1969)

Genetics of host-controlled restriction and modification in Escherichia coli.

Genet. Res. 13, 227-240

Glover, S.W.; J. Schell; N. Symonds; K.A. Stacey (1963)

The control of host-induced modification by phage P1.

Genet. Res. 4, 480-482

Godson, G.N. (1973)

DNA heteroduplex analysis of the relationship between bacteriophages  $\phi$ X174 and S.13.

J. Mol. Biol. 77, 467-477

Godson, G.N.; R.J. Roberts (1976)

A catalogue of cleavages of  $\phi$ X174, S13, G4 and ST-1 DNA by 26 different restriction endonucleases

Virology 73, 561-567

Gold, M.; R. Hansmann; N. Maitra; J. Hurwitz (1964)

The enzymatic methylation of RNA and DNA. VII. Effects of bacteriophage infection on the activity of the methylating enzymes.

Proc. Nat. Acad. Sci. 52, 292-297

Günthert, U.; J. Stutz; G. Klotz (1975)

Restriction and modification in *B. subtilis*. The biochemical basis of modification against *Endo R*. *BsuR* restriction.

*Molec. Gen. Genet.* 142, 185-191

Hattman, S. (1964)

The functioning of T-even phages with unglucosylated DNA in restricting *Escherichia coli* host cells.

*Virology* 24, 333-348

Hattman, S.; T. Fukasawa (1963)

Host-induced modification of T-even phages due to defective glucosylation of their DNA.

*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 297-300

Hattman, S.; S. Schlagmann; L. Goldstein; M. Frohlich (1976)

*Salmonella typhimurium* SA host specificity system is based on deoxyribonucleic acid-adenine methylation.

*J. Bacteriol.* 127, 211-217

Hedgpeth, J.; H.M. Goodman; H.W. Boyer (1972)

DNA nucleotide sequence restricted by the *RI* endonuclease.

*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 3448-3452

Horiuchi, K.; N.D. Zinder (1975)

Site-specific cleavage of single-stranded DNA by a *Hemophilus* restriction endonuclease.

*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2555-2558

Hubacek, J.; S.W. Glover (1970)

Complementation analysis of temperature - sensitive host specificity mutations in *E. coli*.

*J. Mol. Biol.* 50, 111-127

Ikeda, H.; J. Tomizawa (1965b)

Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. III. Studies with small phage particles.

J. Mol. Biol. 14, 120-129

Israel, V. (1967)

The production of inactive phage P22 particles following induction.

Virology 33, 317-322

Kahmann, R.; H.H. Prell (1971)

Complementation between P22 amber mutants and phage L.

Molec. Gen. Genet. 113, 363-366

Kelly, T.J.; H.O. Smith (1970)

A restriction enzyme from Hemophilus influenzae

II. Base sequence of the recognition-site

J. Mol. Biol. 51, 393-409

Kornberg, A. (1974)

DNA Synthesis

W.H. Freeman and Company, San Francisco, 315-327

Kozinski, A.W.; W. Szybalski (1959)

Dispersive transfer of the parental DNA molecule to the progeny of phage  $\phi$ X174.

Virology 9, 260-274

Krüger, D.H.; C. Schroeder; S. Hasen; H.A. Rosenthal (1977)

Active protection by bacteriophage T3 and T7 against E.coli B- and K-specific restriction of their DNA.

Molec. Gen. Genet. 153, 99-106

Kühnlein, U.; W. Arber (1972)

Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*.

XV. The role of nucleotide methylation in in vitro B-specific modification.

J. Mol. Biol. 63, 9-19

Kühnlein, U.; S. Linn; W. Arber (1969)

Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*.

XI. In vitro modification of phage fd replicative form.

Proc. Nat. Acad. Sci., 63, 556-562

Kuo, T.; B.A.D. Stocker (1970)

ES18, a general transducing phage for smooth and nonsmooth *Salmonella typhimurium*.

Virology 42, 621-632

Lautenberger, J.A.; S. Linn (1972)

The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B. I. Purification, subunit structure, and catalytic properties of the modification methylase.

J. Biol. Chem. 247, 6176-6182

Lederberg, J.; E.L. Tatum (1946)

Gene recombination in *E. coli*

Nature 158, 558-564

Lederberg, S.; M. Meselson (1964)

Degradation of non-replicating bacteriophage DNA in non-accepting cells.

J. Mol. Biol. 8, 623-628

Levine, M.; S. Truesdell; T. Ramakrishnan; M.J. Bronson (1975)

Dual control of lysogeny by bacteriophage P22: An antirepressor locus and its controlling elements.

J. Mol. Biol. 91, 421-438

v. Lieres, D. (1974)

Beeinträchtigung der Transduktionshäufigkeit durch Spender-  
mutanten von *Salmonella typhimurium*  
Diplomarbeit, unveröffentlicht

Luria, S.E.; M.L. Human (1952)

A non hereditary host induced variation of bacterial viruses.  
*J. Bacteriol.* 64, 557-569

Margolin, P. (1962)

Genetic fine structure of the leucin operon in *Salmonella*.  
*Genetics* 48, 441-457

Mertz, J.E.; R.W. Davis (1972)

Cleavage of DNA by RI restriction endonuclease generates  
cohesive ends.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 3370-3374

Meselson, M.; R.T. Yuan (1968)

DNA restriction enzyme from *E.coli*.  
*Nature* 217, 1110-1114

Meselson, M.; R. Yuan; J. Heywood (1972)

Restriction and modification of DNA  
*Ann. Rev. Biochem.* 41, 447-466

Murray, P.L.; P.L. Batten; K. Murray (1973)

Restriction of phage Lambda by *E.coli* K.  
*J. Mol. Biol.* 81, 395-407

Nathans, D.; H.O. Smith (1975)

Restriction endonucleases in the analysis and restructuring  
of DNA Molecules.  
*Ann. Rev. Biochem.* 44, 273-293

Notani, N.K. (1974)

Mechanism of bacterial transformation and transfection.  
*Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 14, 39-100

Ozeki, H. (1959)

Chromosome fragments participating in transduction  
in *Salmonella typhimurium*

Genetics 44, 457-470

v. Pel, A.; C. Colson (1974)

DNA restriction and modification systems in *Salmonella*  
II. Genetic complementation between the K and B systems of  
*Escherichia coli* and the *Salmonella typhimurium* system SB,  
with the same chromosomal location.

Molec. Gen. Genet. 135, 51-60

Poisson, S.D. (1837)

Recherches sur la probabilité des ingements en matiere  
criminelle et en matiere civile, precedees des regles  
generales du calcul des probabilités.

Paris

Prell, H.H. (1970a)

Px, a hybrid between the serological unrelated and  
heteroimmune *Salmonella* bacteriophages P22 and Py.

I. Some properties of Py and Px, genetic evidence for the  
hybrid nature of Px<sub>1</sub> and phenotypic mixing between P22, Py  
and Px.

Molec. Gen. Genet. 108, 167-183

Prell, H.H. (1970b)

Px, a hybrid between the serological unrelated and hetero-  
immune *Salmonella* bacteriophages P22 and Py. II. Contribution  
by P22 genetic

Molec. Gen. Genet. 108, 184-202

Prell, H.H. (1975)

Regulation of gene expression in Salmonella phage P22.

II. Regulation of expression of late functions.

Molec. Gen. Genet. 136, 351-360

Raj, A.S.; A.Y. Raj, H. Schmieger (1974)

Phage genes involved in the formation of generalized transducing particles in Salmonella-phage P22

Molec. Gen. Genet. 135, 175-184

Ralston, D.J.; A.P. Krueger (1952)

Phage multiplication on two hosts. Isolation and activity of Staphylococcus phage P1.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (N.Y.) 80, 217-220

Rosner, J. (1973)

Modification-deficient mutants of bacteriophage P1.

Restriction by P1 cryptic lysogens.

Virology 52, 213-222

Sanderson, K.E. (1972)

Linkage map of Salmonella typhimurium Edition IV.

Bacteriol. Rev. 36, 558-586

Schmieger, H. (1968)

Die molekulare Struktur transduzierender Partikel beim Salmonella-Phagen P22. I. Dichtegradienten-Untersuchungen an intakten Phagen.

Molec. Gen. Genet. 102, 336-347

Schmieger, H. (1970)

The molecular structure of the transducing particles of Salmonella phage P22. II. Density gradient analysis of DNA.

Molec. Gen. Genet. 109, 323-337

Schmieger, H. (1971b)

A method for detection of phage mutants with altered transducing ability.

Molec. Gen. Genet. 110, 378-381

Schmieger, H. (1972)

Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities.

Molec. Gen. Genet. 119, 75-88

Schmieger, H.; H. Backhaus (1976)

Altered cotransduction frequencies exhibited by HT-mutants of Salmonella-phage P22.

Molec. Gen. Genet. 143, 307-309

Shibata, T.; T. Ando (1975)

In vitro modification and restriction of phage  $\phi$ 105C DNA with Bacillus subtilisN cell-free extract

Molec. Gen. Genet. 138, 269-279

Siddiqi, Q.; M.S. Fox (1973)

Integration of donor DNA in bacterial conjugation

J. Mol. Biol. 77, 101-123

Smith, J.; W. Arber; U. Kühnlein (1972)

Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. XIV. The role of nucleotide methylation in in vivo  $\lambda$ -specific modification.

J. Mol. Biol. 63, 1-8

Smith, H.O.; D. Nathans (1973)

A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes.

J. Mol. Biol. 81, 419-423

Smith-Keary, P.F.; G.W.P. Dawson (1963)  
Transduction analysis using leucin requiring mutants of  
*Salmonella typhimurium*.  
Genet. Res. 4, 427-440

Starlinger, P. (1959)  
Zur Herkunft des in der Transduktion durch den Phagen P22  
übertragenen Materials.  
Z. Naturforschg. 14b, 523-528

Susskind, M.; A. Wright; D. Botstein (1971)  
Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of  
*Salmonella typhimurium*. II. Genetic evidence for two  
exclusion systems.  
Virology 45, 638-652

Takano, T.; T. Watanabe; T. Fukasawa (1966)  
Specific inactivation of infectious  $\lambda$ -DNA by sonicates of  
restrictive bacteria with R Factors.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 192-198

Takano, T.; T. Watanabe; T. Fukasawa (1968)  
Mechanism of host-controlled restriction of bacteriophage  $\lambda$   
by R factors in *Escherichia coli* K12.  
Virology 34, 290-302

Toussaint, A. (1976)  
The DNA modification function of temperate phage Mu-1  
Virology 70, 17-27

Toussaint, A. (1977)  
DNA modification of bacteriophage Mu-1 requires both host  
and bacteriophage functions.  
J. Virology 23(3), 825-826

Trautner, T.A.; B. Pawlek; S. Bron; C. Anagnostopoulos (1974)  
Restriction and modification in *B. subtilis*. Biological aspects.  
Molec. Gen. Genet. 131, 181-191

Uetake, H.; S. Toyama; S. Hagiwara (1964)  
On the mechanism of host-induced modification. Multiplicity  
activation and thermolabile factor responsible for phage  
growth restriction.  
Virology 22, 202-213

Wilkinson, R.G.; P. Gemski; B.A.D. Stocker (1972)  
Non-smooth mutants of *Salmonella typhimurium*. Differentiation  
by phage sensitivity and genetic mapping.  
J. Gen. Microbiol. 70, 527-554

Wood, W. (1966)  
Host specificity of DNA produced by *E. coli*:  
Bacterial mutations affecting the restriction and modification  
of DNA.  
J. Mol. Biol. 16, 118-133

Zabeau, M.; J. Schell; M. van Montagu (1973)  
The alleviation of host-controlled restriction of unmodified  
phages by function of bacteriophage  $\lambda$  .  
Arch. Int. Physiol. Biochem. 81(5), 990

Zinder, N.D. (1955)  
Bacterial transduction  
Journal of Cellular and Comparative Physiology 45 (Suppl.2) 23-4

Zinder, N.D. (1958)  
Lysogenization and superinfection immunity in *Salmonella*  
Virology 5, 291-326

Zinder, N.D. (1961)

A bacteriophage specific for F-Salmonella strains.  
Science 133, 2069-2070

Zinder, N.D.; J. Lederberg (1952)

Genetic exchange in Salmonella

J. Bacteriol. 64, 679-699

Am Ende dieser Arbeit möchte ich all denen danken, durch deren Hilfe diese Arbeit ermöglicht wurde, in erster Linie jedoch Herrn Professor Dr. Horst Schmieger für unermüdliche Diskussionsbereitschaft und intensive Beratung bei der Planung und Durchführung der Versuche und Interpretation der Ergebnisse.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann und meinen beiden Kindern, ohne deren Verständnis, Opfer und Hilfe diese Arbeit für mich nicht durchführbar gewesen wäre.

# Lebenslauf:

Am 26. Februar 1945 wurde ich in Bad Wiessee geboren. Meine Eltern sind Christa Rühling, geb. Elter und Rolf Rühling. Von 1951-1955 besuchte ich die Volksschule Bad Wiessee, anschließend die Oberrealschule Tegernsee, wo ich 1965 das Abitur bestand. Im August desselben Jahres heiratete ich den Patentanwalt Dr. Hermann Kinkeldey. Im März 1966 wurde unsere Tochter Daniela, im November 1967 unser Sohn Maximilian geboren. Im Sommersemester 1969 begann ich das Studium der Biologie an der Universität München, das ich nach Beendigung der Diplomarbeit und bestandener mündlicher Prüfung im Frühjahr 1973 abschloß. Seit Sommer 1973 arbeitete ich am Genetischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Horst Schmieger an der vorliegenden Arbeit.





